

Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit

pl

Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit

REF 06N24-010

G66498R06

B6N24P

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 PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit przeznaczony jest do wykrywania rearanżacji chromosomowych obejmujących gen receptora beta płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. *platelet derived growth factor receptor beta*, PDGFRB) na chromosomie 5q32-q33 z użyciem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH).

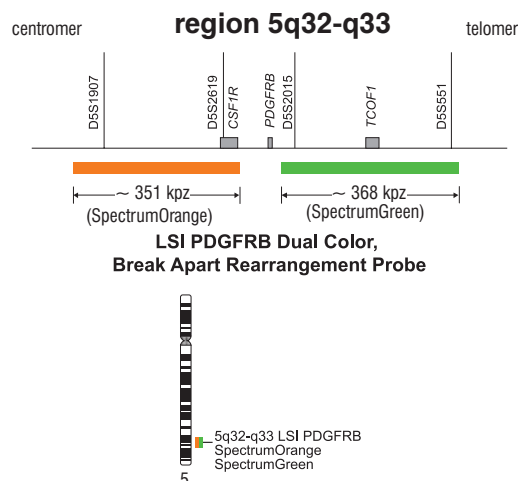
Wprowadzenie

Rearanżacja genu PDGFRB jest nawracającą nieprawidłowością w chorobach mieloproliferacyjnych semi-molekularnych, zaklasyfikowanych do mieloidalnych i limfoidalnych nowotworów z eozynofilią i nieprawidłowościami genów PDGFRA, PDGFRB lub FGFR1.^{1,2} Rearanżacja genu PDGFRB może być wynikiem fuzji z jednym z aż piętnastu różnych znanych genów partnerskich.³

Zestaw sond Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit identyfikuje rearanżacje z udziałem genu PDGFRB poprzez wykrycie rozdzielenia sygnałów emitowanych przez sondę LSI PDGFRB SpectrumOrange oraz sondę LSI PDGFRB SpectrumGreen, wynikającego z pęknięcia chromosomów pomiędzy obszarami docelowymi hybrydyzacji obu sond.

Opis sondy

Wyznakowana na pomarańczowo sonda SpectrumOrange (Chr5:149100088-149451543, March 2006 assembly)⁴ o długości około 351 kpz jest położona centromerycznie względem genu PDGFRB. Wyznakowana na zielono sonda SpectrumGreen (Chr5:149543318-149911781, March 2006 assembly)⁴ o długości około 368 kpz jest położona telomerycznie względem genu PDGFRB.



Odczynniki

1. Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (nr produktu: 30-231038)

(1 fiolka, 10 µL w jednej fiolce). 425 ng/µL, sonda DNA znakowana fluoroforem oraz blokujące DNA w Tris-EDTA.

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

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

Karty charakterystyki dla wszystkich dostarczonych odczynników są dostępne u przedstawiciela firmy Abbott Molecular.

Zasady przechowywania

Zestaw sond Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit należy przechowywać w temp. -20 °C (± 10 °C) bez dostępu światła.

Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit jest transportowany w suchym lodzie.

Jeśli stan dostarczonych odczynników jest inny niż podany 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*

Sonda rearanżacyjna Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe



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 postępować 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 kosmetyków 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 zakażne materiały odkazić, a następnie utylizować zgodnie z miejscowymi, 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 styczności: Zasięgnąć porady / zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi przepisami.

Środki ostrożności dotyczące użytkowania

- Zestaw sond Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit jest przeznaczony do użytku wyłącznie z próbkami, z którymi postępowano i które przechowywano zgodnie z opisem podanym w niniejszej instrukcji używania.
- Zestawu sond Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit nie stosować po upływie daty ważności.
- Należy przestrzegać podanych zaleceń. Niezastosowanie się do tych zaleceń może skutkować uzyskiwaniem błędnych wyników.

Środki ostrożności dotyczące pracy laboratorium

- Wszelkie materiały pochodzenia biologicznego powinny być traktowane jako czynniki potencjalnie zakażne. Jako że często nie jest możliwe stwierdzenie zakaźności, podczas pracy z wszystkimi próbkami pochodzenia ludzkiego i szkiełkami kontrolnymi należy przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności.
- Próbkę należy chronić przed działaniem kwasów, silnych zasad oraz wysokich temperatur. Czynniki te powodują uszkodzenie DNA oraz mogą skutkować uzyskaniem błędnych wyników testu FISH.
- Nieprzestrzeganie wszystkich procedur denaturacji preparatów, hybrydyzacji i detekcji może skutkować uzyskaniem nieakceptowalnych lub błędnych wyników.
- Fluorofory szybko ulegają fotobłaknięciu pod wpływem światła. Ograniczenie dostępu światła do wszystkich preparatów i zestawów sond zawierających fluorofory, jak również przechowywanie preparatów i zestawów sond bez dostępu światła, zmniejsza tę degradację. Dotyczy to wszystkich kroków, w trakcie których opracowuje się hybrydizowany preparat. Wszystkie etapy procedury, do przeprowadzenia których nie jest wymagane światło (inkubacje, płukania itd.), należy przeprowadzać bez dostępu światła lub przy słabym świetle.
- Zestaw sond Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit zawiera formamid, który ma właściwości teratogenne. Unikać zanieczyszczenia skóry i błon śluzowych.
- Do pomiaru temperatury roztworów, temperatury w łaźniach wodnych i inkubatorach używać skalibrowanych termometrów.
- Przed każdym użyciem należy zawsze sprawdzić temperaturę roztworów płuczających, mierząc temperaturę roztworu w kominku do barwienia przy użyciu skalibrowanego termometru.

- Wszystkie substancje niebezpieczne należy usuwać zgodnie z zasadami usuwania materiałów niebezpiecznych obowiązującymi w danej placówce.

Procedura badania

Wymagane materiały

- Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Materiały wymagane, lecz niedostarczone

Odczynniki laboratoryjne

- Olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej
- Etanol (100%). Przechowywać w temperaturze pokojowej.
- Oczyszczona woda
- Klej kauczukowy
- 12 N HCl
- 1 N NaOH
- Barwnik kontrastowy DAPI II/Antifade (nr kat. 06J50-001)
- 20X SSC (nr kat. 02J10-032)
- NP-40 (nr kat. 07J05-001)

Sprzęt laboratoryjny

- Szkiełka mikroskopowe, odtłuszczone
- Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 22 mm x 22 mm
- Pipeta mikrolitrowa (1 do 10 µL) oraz jałowe końcówki
- Timer
- Mikrowirówka
- Cylindry miarowe (100 mL do 1000 mL)
- Łaźnie wodne (70 do 80 °C)
- Łaźnia wodna (37 °C)
- Znacznik (ołówki) z diamentową końcówką lub marker odporny na działanie rozpuszczalnika
- Pęseta
- Strzykawka jednorazowego użytku (5 mL)
- Pipety jednorazowego użytku (5 mL do 20 mL)
- Naczynka Coplina (12 x 50 mL); zalecany typ: pionowy kominiek do barwienia firmy Wheaton, nr 900570
- Mikroskop fluorescencyjny wyposażony w zalecane filtry (patrz rozdział „Sprzęt mikroskopowy oraz akcesoria”)
- Skalibrowany termometr
- Kasetka na szkiełka z zamykaną pokrywą oraz desykantem
- Mieszadło magnetyczne
- Pehametr
- Worteks
- Filtr o wielkości porów 0,45 µm
- Inkubator o temp. 37 °C
- Płyta grzejna do preparatów (45 do 50 °C)
- Aparat ThermoBrite®
- Wkłady do kontroli wilgotności w aparacie ThermoBrite

Sprzęt mikroskopowy oraz akcesoria

Mikroskop Do oględzin rezultatów hybrydyzacji wymagany jest mikroskop fluorescencyjny z systemem epiiluminacji. W celu uzyskania optymalnego przebiegu oględzin preparatu FISH należy sprawdzić, czy mikroskop działa prawidłowo. Mikroskop przystosowany do oględzin rezultatów typowego barwienia DNA barwnikiem DAPI, jodkiem propidyny lub kwinakryną może nie być odpowiedni do pracy z testami FISH. Zaleca się rutynowe czyszczenie mikroskopu oraz okresowe strojenie, zwłaszcza dostrojenie/centrowanie lampy rtęciowej, wykonywane przez inżyniera serwisowego producenta.

Źródło światła wzbudzającego Rekomendowane źródło światła wzbudzającego to 100-watowa lampa rtęciowa lub lampa o zbliżonym natężeniu oraz spektrum emitowanego światła. Należy zapisać liczbę godzin pracy żarówki i wymienić ją, zanim upływie wyznaczony czas jej zużycia. Należy upewnić się, czy lampa jest właściwie wyregulowana.

Obiektywy Używając mikroskopu wyposażonego w 100-watową lampę rtęciową lub jej odpowiednik, należy stosować obiektywy do fluorescencji z imersją olejową o aperturze numerycznej $\geq 0,75$. Obiektyw powiększający 40-krotnie z okulem powiększającym 10-krotnie jest właściwy do skanowania próbek w celu wybrania obszarów odpowiednich do zliczania sygnałów. Satisfakcjonujące rezultaty zliczania sygnałów FISH uzyskuje się przy użyciu obiektywów achromatycznych z imersją olejową, powiększających 63-krotnie lub 100-krotnie.

Olejek imersyjny Do obiektywów należy używać olejku imersyjnego przewidzianego dla niewielkiej autofluorescencji i przeznaczonego do użytku w mikroskopii fluorescencyjnej.

Filtry Hybrydyzacja sondy SpectrumOrange do obszarów docelowych DNA widoczna jest poprzez zastosowanie pomarańczowego barwnika fluorescencyjnego. Hybrydyzacja sondy SpectrumGreen do obszarów docelowych DNA widoczna jest poprzez zastosowanie zielonego barwnika fluorescencyjnego. DNA, które nie hybrydowało do sond, będzie fluoryzowało na niebiesko dzięki zastosowaniu barwnika kontrastowego DAPI II.

Protokół badania

Przed przystąpieniem do przygotowania próbek, patrz rozdział „OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI” w niniejszej instrukcji użytkowania.

Przygotowanie odczynników roboczych

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

Przygotować rozcienienia (v/v) 70% oraz 85% etanolu, stosując 100% etanol i oczyszczoną wodę. Przygotowane roztwory przechowywać w temperaturze otoczenia w szczelnie zamkniętych pojemnikach. Roztwory można stosować nie dłużej niż jeden tydzień, chyba że doszło do wyparowania, rozcienienia lub zmętnienia roztworu na skutek nadmiernego użycia.

Roztwór 20X SSC

Rozpuścić 66 g soli 20X SSC w 200 mL oczyszczonej H₂O w odpowiednim naczyniu. W razie potrzeby, przy pomocy pehametru zmierzyć pH w temperaturze otoczenia i doprowadzić je do wartości 5,3 przy użyciu 12 N HCl. Roztwór przenieść do cylindra miarowego, a następnie dodać oczyszczoną H₂O do uzyskania końcowej objętości wynoszącej 250 mL. Przygotowany roztwór wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przygotowany roztwór wyjąć do przechowywania w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

Roztwór 2X SSC

Dokładnie wymieszać 100 mL roztworu 20X SSC z 850 mL oczyszczonej H₂O w odpowiednim naczyniu. Używając pehametru, zmierzyć pH w temperaturze otoczenia, aby stwierdzić, czy wartość pH mieści się w zakresie od 7,0 ± 0,2. W razie potrzeby, doprowadzić do uzyskania odpowiedniej wartości pH przy użyciu 1N NaOH. Dodać oczyszczoną H₂O do uzyskania końcowej objętości wynoszącej 1 litr. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przygotowany roztwór wyjściowy przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

Roztwór płuczący 0,4X SSC/0,3% NP-40

Dokładnie wymieszać 20 mL roztworu 20X SSC z 950 mL oczyszczonej H₂O w odpowiednim naczyniu. Dodać 3 mL NP-40 i dokładnie wymieszać aż do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Przy pomocy pehametru zmierzyć pH w temperaturze otoczenia i doprowadzić je do wartości 7,0 do 7,5 przy użyciu 1 N NaOH. Dodać oczyszczoną H₂O do uzyskania końcowej objętości wynoszącej 1 litr. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przygotowany roztwór wyjściowy przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu. Roztwór użyty w badaniu wylać po każdym dniu pracy.

Roztwór płuczący 2X SSC/0,1% NP-40

Dokładnie wymieszać 100 mL roztworu 20X SSC z 850 mL oczyszczonej H₂O w odpowiednim naczyniu. Dodać 1 mL NP-40 i dokładnie wymieszać aż do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Przy pomocy pehametru zmierzyć pH w temperaturze otoczenia i doprowadzić je do wartości 7,0 ± 0,2 przy użyciu 1 N NaOH. Dodać oczyszczoną H₂O do uzyskania końcowej objętości wynoszącej 1 litr. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przygotowany roztwór wyjściowy przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu. Roztwór użyty w badaniu wylać po każdym dniu pracy.

Pobranie i przygotowanie próbki do analizy

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

Przygotowanie obszaru docelowego próbki

UWAGA: Rozpocząć procedurę **automatycznej denaturacji/hybrydyzacji sondy** przed zakończeniem opisanego w tym rozdziale kroku 4., aby mieć wystarczająco dużo czasu na rozmrożenie materiałów.

1. Roztwór 2X SSC przenieść do kominka do barwienia.
2. Przed użyciem kominek do barwienia z 2X SSC przenieść do gorącej łaźni wodnej na około 30 minut, aby upewnić się, że roztwór osiągnął temp. 37 ± 1 °C.
3. Przy użyciu skalibrowanego termometru sprawdzić, czy temperatura roztworu 2X SSC wynosi 37 ± 1 °C.
4. Zanurzyć preparaty w roztworze 2X SSC o temp. 37 ± 1 °C na 30 minut.
5. Wyjąć preparaty z roztworu 2X SSC, niezwłocznie przenieść je do kominków do barwienia zawierających 70% EtOH na co najmniej 2 minuty i potrząsać nimi wewnątrz kominka przez 1 do 3 sekund. Po zanurzeniu preparatów w 70% EtOH zanurzyć je kolejno w 85% EtOH na co najmniej 2 minuty, a następnie w 100% EtOH na co najmniej 2 minuty.

UWAGA: W jednym kominku do barwienia nie należy zanurzać więcej niż czterech preparatów równocześnie.

6. Preparaty pozostawić na powietrzu do wyschnięcia.
7. Po odwodnieniu w EtOH umieścić preparaty na płycie grzejnej o temp. 50 °C ± 5 °C na maksymalnie 2 minuty, aby zapewnić ich całkowite wyschnięcie przed nałożeniem sondy.

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

Automatyczna denaturacja/hybrydyzacja sondy

1. Wyjąć sondę(y) DNA, bufor LSI/WCP Hybridization Buffer oraz oczyszczoną wodę z miejsca przechowywania i pozwolić odczynnikom na osiągnięcie temperatury otoczenia.
2. Sondę(y) DNA oraz bufor LSI/WCP Hybridization Buffer wytrząsać na worteksie przez 2 do 3 sekund.
3. Probówki poddać wirowaniu przez 2 do 3 sekund.
4. Przenieść 7 µL buforu LSI/WCP Hybridization Buffer, 2 µL oczyszczonej wody oraz 1 µL sondy DNA do probówki mikrowirówkowej o poj. 1,5 mL.
5. Wytrząsnąć na worteksie, a następnie mieszaninę ponownie krótko odwirować.
6. Przy użyciu pipety mikrolitrowej nałożyć 10 µL mieszaniny sondy na obszar docelowy próbki, natychmiast nakładając szkiełko nakrywkowe, nie wprowadzając pęcherzyków powietrza.
7. Szkiełko nakrywkowe zabezpieczyć klejem kauczkowym.
8. Przed umieszczeniem preparatów w aparacie włożyć dwa nawilżone wkłady ThermoBrite w odpowiednie szczeliny w pokrywie aparatu ThermoBrite. Wkłady umieścić w taki sposób, aby opierały się na wypustkach w pokrywie. Instrukcje dotyczące ponownego stosowania wkładów do kontroli wilgotności w kolejnych seriach oznaczeń, patrz Instrukcja obsługi ThermoBrite.
9. Po włożeniu wkładów do aparatu ThermoBrite nawilżyć je wodą destylowaną. Przed pierwszym użyciem każdy z wkładów nawilżyć destylowaną lub dejonizowaną wodą w objętości 8 do 10 mL.
10. Włączyć zasilanie systemu ThermoBrite Denaturation/Hybridization System („On”).

UWAGA: Główny włącznik zasilania aparatu ThermoBrite umieszczony jest na tylnym panelu. Aparat zasygnalizuje uruchomienie sygnałem dźwiękowym. Menu główne wyświetli się po osiągnięciu przez aparat temperatury 37 °C.

11. Zaprogramować aparat ThermoBrite według poniższych parametrów:

- Denat Time: 2 minuty
- Denat Temp: 73 °C
- Hyb Time: 12 do 24 godzin
- Hyb Temperature: 37 °C
- Denat = denaturacja
- Hyb = hybrydyzacja

- Gdy wyświetli się odpowiedni komunikat, umieścić szkiełka na powierzchni grzejnej aparatu ThermoBrite. Delikatnie przesunąć szkiełka w kierunku środka płyty, dopasowując krawędź szkiełka zgodnie z oznaczeniami na elemencie ustawiającym szkiełka. Matowa część szkiełka powinna wystawać poza krawędź powierzchni grzejnej. Upewnić się, czy szkiełka leżą płasko i czy są prawidłowo ustawione względem oznaczeń na elemencie ustawiającym szkiełka.

UWAGA: Jeśli hybrydyzacji poddawanych jest mniej niż 12 preparatów, należy dołożyć pustych szkiełek tak, aby razem było ich 12.

- Zamknąć pokrywę aparatu ThermoBrite. Kursor powinien wskazywać linię „Run a PGM”. Nacisnąć klawisz „Enter”, aby zatwierdzić wskazaną opcję.

Procedura mycia

- Przenieść 70 mL 0,4X SSC/0,3% NP-40 oraz 70 mL 2X SSC/0,1% NP-40 do osobnych kominków do barwienia. Przed użyciem przenieść kominek do barwienia zawierający 0,4X SSC/0,3% NP-40 do gorącej łaźni wodnej na co najmniej 60 minut. Roztwór 2X SSC/0,1% NP-40 stosować w temperaturze otoczenia. Zużyć przygotowane roztwory tego samego dnia, resztę wylać.
- Przy użyciu skalibrowanego termometru sprawdzić, czy temperatura roztworu 0,4X SSC/0,3% NP-40 wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Preparaty wyjąć z aparatu ThermoBrite.
- Usunąć szkiełka nakrywkowe z preparatu i natychmiast zanurzyć preparat w 0,4X SSC/0,3% NP-40. Potrząsać preparatami znajdującymi się w kominku przez 1 do 3 sekund. Powyższe czynności powtórzyć w przypadku wszystkich pozostałych szkiełek, dla maksymalnie czterech szkiełek. Rozpocząć odmierzenie czasu w momencie, kiedy wszystkie cztery szkiełka są zanurzone.

UWAGA: Dla utrzymania właściwej temperatury roztworu 0,4X SSC/0,3% NP-40 należy płukać cztery preparaty równocześnie. Jeśli barwionych jest mniej niż cztery preparaty, należy dołożyć pustych szkiełek o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich cztery.

- Wyjąć preparaty po 2 minutach ± 30 sekund.
- Zanurzyć preparaty w kominku do barwienia z 2X SSC/0,1% NP-40. Potrząsać preparatami znajdującymi się w kominku do barwienia przez 3 do 5 sekund.
- Szkiełka wyjąć z roztworu 2X SSC/0,1% NP-40 po zanurzeniu ich w nim na 5 do 60 sekund.

UWAGA: W przypadku płukania dodatkowych preparatów należy upewnić się, czy temperatura roztworu płuczącego wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$ przed rozpoczęciem płukania.

Procedura barwienia kontrastowego

- Osuszyć każde ze szkiełek, dotykając dolną krawędź szkiełka do papierowego ręczniczka (lub odpowiednika) i wycierając spód szkiełka (stronę, na której nie ma preparatu) do sucha papierowym ręcznikiem (lub odpowiednikiem).
- Na maksymalnie 2 godziny pozostawić oparte na długiej krawędzi szkiełka do wyschnięcia na powietrzu, w ciemności, aby ułatwić parowanie oraz zapobiec nagromadzeniu się roztworu 2X SSC/0,1% NP-40.
- Wyjąć barwnik kontrastowy DAPI II z miejsca przechowywania i pozostawić odczynnik do momentu osiągnięcia przez niego temperatury otoczenia.
- Wytężyć barwnik kontrastowy DAPI II na worteksie) w ciągu 2 do 3 sekund.
- Probówkę poddać wirowaniu przez 2 do 3 sekund.
- Używając pipety mikrolitrowej, nanieść 10 μL barwnika kontrastowego DAPI II na każdy obszar docelowy preparatu na szkiełku, a następnie nałożyć szkiełka nakrywkowe. Cały proces powtórzyć dla każdego szkiełka.
- Przed rozpoczęciem oględzin pod mikroskopem odczekać co najmniej 10 minut.

Procedura archiwizacji

Preparaty po przeprowadzonej hybrydyzacji przechowywać w temp. -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$), bez dostępu światła. W tych warunkach preparaty mogą być przechowywane z pochłaniaczem wilgoci przez maksymalnie 3 tygodnie po nałożeniu barwnika kontrastowego DAPI II, bez znaczącej utraty intensywności fluorescencji sygnałów.

Ocena preparatów

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

Użycie filtra Vysis...	pozwala na równoczesne wzbudzenie i emisję fluoroforów...
Single Band Green	fluorofor zielony (SpectrumGreen)
Single Band Orange	fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange)
Dual Band Orange/Green v2	fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange) i zielony (SpectrumGreen)
Triple Band - DAPI, Green oraz Orange	DAPI, fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange) i zielony (SpectrumGreen)

Można również stosować filtry odpowiadające filtrom firmy Vysis pod względem optyki. Na przykład, kostka Chroma® 82000 z filtrem 82102 odpowiada filtrowi Vysis Orange/Green v2.

Interpretacja i raportowanie wyników

Kontrola jakości

Ocena adekwatności preparatu

Ocenę adekwatności hybrydyzacji preparatu przeprowadza się na podstawie opisanych poniżej kryteriów. Jeśli kryteria te nie są spełnione, szkiełka z preparatem nie należy oceniać.

- Morfologia jąder komórkowych: Kontury jąder komórkowych powinny być zasadniczo widoczne i nienaruszone.
- Tło: Tło powinno być ciemne lub czarne i stosunkowo wolne od fluoryzujących zanieczyszczeń czy zamglenia.
- Intensywność sygnału sondy: Sygnały powinny być jasne, zwarte, o okrągłych lub owalnych kształtach, wyraźne i łatwe do oceny.

Liczenie sygnałów

Używając właściwych filtrów wymienionych powyżej, dwóch technik przeprowadza osobne zliczenia wszystkich obecnych wzorów sygnałów w 100 jądrach. Pierwszy technik zlicza jądra po lewej stronie obszaru docelowego hybrydyzacji (zgodnie z najlepszą oceną), zaś drugi technik zlicza jądra po prawej stronie obszaru docelowego hybrydyzacji (zgodnie z najlepszą oceną). Wskazówki dotyczące liczenia sygnałów dwukolorowych, patrz Tabela 1.

- Wybrać tylko jądra nienaruszone, które nie są zwinięte, nie nachodzą na siebie ani nie są zasłonięte przez szczątki komórkowe.
- Unikać zliczania preparatów lub obszarów znajdujących się na preparatach z nadmierną, nieswoistą hybrydyzacją lub wieloma jądrami ze zbyt małą liczbą sygnałów lub bez sygnałów.
- Unikać zliczania jąder ze zbitkami lub chmurą sygnałów.
- Sygnały tego samego koloru mogą różnić się intensywnością w danym jądrze. Z tego względu może być konieczne użycie właściwego filtra jednopasmowego i/lub wyregulowanie płaszczyzny ogniskowej.
- Sygnały tego samego koloru, które się dotykają, bez względu na ich wielkość, są liczone jako jeden sygnał. Jeśli widoczny jest mały odcinek sygnału łączący oddzielone sygnały, także liczyć jako jeden sygnał.
- Para sygnałów pomarańczowych/zielonych zachodzących na siebie lub z odstępem wynoszącym mniej niż dwie szerokości sygnału liczy się jako sygnał fuzyjny.
- Jeśli dla danej próbki uzyskano słaby nieprawidłowy wzór znakowania FISH, należy użyć odpowiedniego filtra jednopasmowego w celu potwierdzenia uzyskanego wzoru. Niezastosowanie się do tego zalecenia może skutkować niedokładną identyfikacją sygnałów.
- Nie zliczać komórki w przypadku jakichkolwiek wątpliwości, co do adekwatności komórki do zliczania.

Tabela 1
Wskazówki dotyczące liczenia sygnałów dwukolorowych

Legenda: ○ = sygnał zielony ● = sygnał pomarańczowy		
1		Jeśli jądra zachodzą na siebie, nie należy ich liczyć .
2		Liczyć jako dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone. Jeden sygnał pomarańczowy jest rozmyty.
3		Liczyć jako jeden sygnał pomarańczowy, jeden sygnał zielony i jeden sygnał fuzyjny. Para sygnałów pomarańczowych/zielonych zachodzących na siebie lub z odstępem mniejszym niż 2 szerokości sygnału pomarańczowego lub 2 szerokości sygnału zielonego liczy się jako sygnał fuzyjny. Górna para jest sygnałem fuzyjnym. Dolna para nie jest sygnałem fuzyjnym.
4		Liczyć jako dwa sygnały fuzyjne. Górna para sygnałów pomarańczowych/zielonych oddzielona jest odstępem mniejszym niż 2 szerokości sygnału. Dolna para sygnałów zachodzi na siebie.
5		Liczyć jako jeden sygnał pomarańczowy, jeden sygnał zielony i jeden sygnał fuzyjny. Sygnał zielony jest rozszczępiony.

Ograniczenia stosowania

Interpretacja wyników FISH powinna być dokonana przy użyciu stosownych kontroli i technik analitycznych, biorąc pod uwagę dane pochodzące z innych badań klinicznych i diagnostycznych.⁹ Każde laboratorium powinno ustalić analityczną wartość normy dla punktu odcięcia (cut-off) dla każdego żądanego wzoru sygnału nieprawidłowego.⁹

OGRANICZENIA PROCEDURY

- Zestaw sond Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit przeznaczony jest do stosowania wraz z dodatkowymi biomarkerami, morfologią oraz innymi informacjami klinicznymi.
- Jeśli dla danej próbki uzyskano słaby nieprawidłowy wzór znakowania FISH, należy użyć odpowiedniego filtra jednopasmowego w celu potwierdzenia uzyskanego wzoru. Niezastosowanie się do tego zalecenia może skutkować niedokładną identyfikacją sygnałów.

Oczekiwane wyniki

Oczekiwanym prawidłowym wzorem sygnałów sondy Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe są dwa sygnały fuzyjne pomarańczowo-zielone, widoczne jako przylegające do siebie sygnały pomarańczowe i zielone, nieznacznie od siebie oddalone na skutek obecności obszaru nieznakowanego (przerwy) pomiędzy dwiema sondami.

Oczekiwanym nieprawidłowym wzorem sygnałów sondy Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe przy rearanżacji z udziałem genu PDGFRB jest jeden sygnał pomarańczowy, jeden sygnał zielony i jeden sygnał fuzyjny. Mogą pojawić się też inne wzory sygnałów nieprawidłowych. Przy ich interpretacji przydatna może być analiza metafaz.

SZCZEGÓŁOWA CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Czułość i swoistość analityczna metafaz

Swoistość analityczna zdefiniowana jest jako odsetek sygnałów emitowanych przez sondy, które hybrydują do właściwego *locus* i nie hybrydują do żadnego innego miejsca. Czułość analityczna zdefiniowana jest jako odsetek sekwencji docelowych chromosomów, dla których uzyskano oczekiwany wzór sygnałów prawidłowych.

Swoistości analityczne sondy Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe w odniesieniu do ich docelowych *loci* chromosomowych zostały wyznaczone z użyciem chromosomów metafazowych przygotowanych z kultur krwi obwodowej pięciu preparatów z próbkami o prawidłowym kariotypie. Lokalizacja hybrydizacji każdego sygnału FISH na chromosomach 20 kolejnych jąder metafazowych na każdym z pięciu szkiełek została oceniona łącznie dla 200 *loci* docelowych.

Dla każdej sondy i próbki określono liczbę sygnałów FISH chromosomów metafazowych hybrydujących do właściwego *locus*, oraz liczbę sygnałów FISH chromosomów metafazowych hybrydujących do niewłaściwego *locus*.

Swoistość każdej sondy wyliczono jako liczbę sygnałów FISH chromosomów metafazowych hybrydujących do prawidłowego *locus* podzieloną przez całkowitą liczbę hybrydujących sygnałów FISH chromosomów metafazowych, pomnożoną następnie przez 100 w celu uzyskania wartości procentowej.

Swoistości analityczne sondy Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe wyniosły 100%, jak pokazano w Tabeli 2.

Czułość każdej sondy wyliczono jako liczbę sygnałów FISH chromosomów metafazowych hybrydujących do prawidłowego *locus* podzieloną przez całkowitą liczbę 200 *loci* docelowych, pomnożoną następnie przez 100 w celu uzyskania wartości procentowej. Czułości analityczne sondy Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe wyniosły 100%, jak pokazano w Tabeli 2.

Tabela 2
Swoistość i czułość analityczna metafaz

Sonda	Prawidłowa cytogenetycznie sekwencja docelowa	Liczba oczekiwana	Liczba sygnałów hybrydujących do właściwego <i>locus</i> docelowego		Liczba sygnałów hybrydujących do niewłaściwego <i>locus</i> docelowego	
LSI PDGFRB (Cen)	5q32-q33	200	200	0	100	100
LSI PDGFRB (Tel)	5q32-q33	200	200	0	100	100

Działanie

Działanie oceniono poprzez oznaczenie pięciu próbek pobranych od zdrowych pacjentów (próbek pobranych od osób, u których nie stwierdzono rearanżacji obejmującej region genu PDGFRB na chromosomie 5q32-q33 na podstawie wyników wcześniejszych badań przeprowadzonych inną metodą) oraz nieprawidłowej próbki (próbki pobranej od pacjenta, u którego stwierdzono rearanżację obejmującą region genu PDGFRB na chromosomie 5q32-q33 na podstawie wyników wcześniejszych badań przeprowadzonych inną metodą).

Zaślepienie, kodowane szkiełka zostały przygotowane z użyciem próbek nieprawidłowych i prawidłowych pod względem PDGFRB.

Hybrydizacji poddano łącznie pięć prawidłowych preparatów, każdy przygotowany z innej próbki, oraz trzy preparaty przygotowane z jednej nieprawidłowej próbki. Wzory sygnałów zostały zliczone dla każdego preparatu w oparciu o 200 dających się ocenić jąder interfazowych. Każdy z dwóch techników ocenił 100 jąder na jeden preparat, uzyskując w sumie 200 jąder na jeden preparat.

Oczekiwanym prawidłowym wzorem sygnałów sondy Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe są dwa sygnały fuzyjne pomarańczowo-zielone, widoczne jako przylegające do siebie sygnały pomarańczowe i zielone, nieznacznie od siebie oddalone na skutek obecności obszaru nieznakowanego (przerwy) pomiędzy dwiema sondami.

Oczekiwanym nieprawidłowym wzorem sygnałów sondy Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe w próbce z rearanżacją obejmującą gen PDGFRB jest jeden sygnał pomarańczowy, jeden sygnał zielony i jeden sygnał fuzyjny.

Wyniki pokazano w Tabeli 3.

Tabela 3
Zakres zliczeń sygnałów 2F oraz 1R1G1F (dla 200 jąder)

	2F	1R1G1F
prawidłowe	155-188	0-2
nieprawidłowe*	74-96	82-106

* Sygnały liczono w trzech preparatach przygotowanych z pojedynczej próbki pobranej od pacjenta.

Piśmiennictwo

1. The International Agency for Research on Cancer. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue*. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al, eds. 4th ed. World Health Organization; 2008.
2. Leirman E, Cools J. Recent breakthroughs in the understanding and management of chronic eosinophilic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(9):1295-1304.
3. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. 3rd ed. Wiley-Blackwell; 2009.
4. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.
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 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.
9. 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.

Pomoc techniczna:

W przypadku problemów technicznych prosimy o kontakt z przedstawicielem firmy Abbott Molecular w Polsce lub o odwiedzenie strony internetowej firmy Abbott Molecular pod adresem <http://www.abbottmolecular.com>.

Adres upoważnionego przedstawiciela

Abbott GmbH

Max-Planck-Ring 2

65205 Wiesbaden, Germany

Phone: +49-6122-580

Zestaw sond Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit jest chroniony patentami amerykańskimi o numerach 5 663 319 oraz 5 491 224, przyznanych firmie Abbott Molecular. Bezpośrednio znakowane fluorescencyjne sondy Vysis LSI są chronione patentami amerykańskimi o numerach RE40 494, 6 596 479, 7 115 709, 5 756 696, 6 280 929 oraz 6 607 877, przyznanych firmie Abbott Molecular Inc. na mocy wyłącznej licencji przez The Regents of the University of California. Metody detekcji wielu sygnałów hybrydizacyjnych jednocześnie są chronione patentem amerykańskim o nr 6 203 977, przyznanym firmie Abbott Molecular Inc. na mocy wyłącznej licencji przez Uniwersytet Yale. 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

© 2011, 2021 Abbott. Wszelkie prawa zastrzeżone.

www.abbottmolecular.com

luty 2021