



A Sysmex Group Company



## Інструкція із застосування

REF: LPH 006-S / LPH 006

Зонд на делецію 13q14.3

### ТІЛЬКИ ДЛЯ ПРОФЕСІЙНОГО ВИКОРИСТАННЯ

Більш детальна інформація доступна на [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

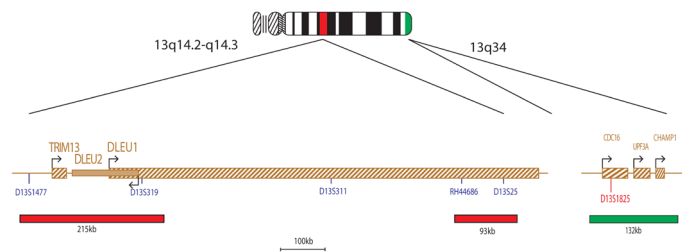
Флуоресцентна гібридизація *in situ* (англ. Fluorescence *in situ* hybridization, (FISH)), метод, який дозволяє виявляти послідовності ДНК в метафазних хромосомах або в інтерфазних ядрах на стаціонарних цитогенетичних зразках. Методика використовує ДНК-зонди, які гібридизуються з цілою хромосомою або окремими унікальними послідовностями, і служить потужним доповненням до класичної цитогенетики. Останні розробки призвели до того, що цей метод тепер може бути застосований в якості основного діагностичного інструменту пренатального, гематологічного та патологічного хромосомного аналізу. ДНК-мішень, після фіксації і денатурації, доступна для комплементарного приєднання аналогічно денатурованих, флуоресцентно мічених ДНК-зондів з комплементарними послідовностями. Після гібридизації, не зв'язаний і неспецифічно зв'язаний ДНК-зонд видаляють і ДНК контрастно зафарбовується для візуалізації. Флуоресцентна мікроскопія потім дозволяє візуалізувати гібридизований зонд на матеріалі-мішені.

#### Інформація про зонд

Аномалії 13q хромосоми зустрічаються в 16-40% випадків множинних мієлом і пов'язані з поганим прогнозом<sup>1,2</sup>. Комплексний аналіз показав, що в 90% пацієнтів область 13q14 була порушена і у 68% також було показано залучення 13q21 області – критичної області для всіх, крім 8 пацієнтів у яких це була область 13q14<sup>3</sup>. Делеції, що впливають на 13q14 також є найбільш частими структурними генетичними аномаліями при В-клітинному хронічному лімфоцитарному лейкозі (В-CLL)<sup>4</sup>. Цей регіон був гетерозиготно делетований у 30-60% пацієнтів і гомозиготно делетований в 10-20% пацієнтів з В-CLL<sup>5</sup>. Останнім часом було показано, що коефіцієнт виживання був подібним в обох групах<sup>6</sup>. Два некодуючі РНК-гени DLEU1 і DLEU2, і генетичний маркер D13S319, охоплюють патогенну критичну область 13q14<sup>7</sup>. DLEU1 вважається найбільш вірогідним CLL асоційованим кандидатом геном-супресором пухлин в 13q14 області<sup>8</sup>. Згодом було встановлено, що D13S319, розташований між генами RB1 та D13S25 і в локусі DLEU1, делетований в 44% випадків CLL<sup>9</sup>. Також було постулювано, що теломерний ген в регіоні D13S319, який охоплює D13S25, може мати важливе значення у випадках гемізиготних делецій і що цей ген являє собою передбачуваний ген-супресор пухлин<sup>10</sup>.

#### Специфікація зондів

13q14.2-q14.3, червоний  
13 qter, 13q34, зелений



Зонд 13q14.2-q14.3, мічений червоним кольором, охоплює D13S319 і D13S25 маркери. Специфічний зонд до субтеломерної ділянки 13qter (клон 163C9), мічений зеленим кольором, дозволяє ідентифікувати 13 хромосому і виступає в якості контрольного зонду.

#### Матеріали, що надаються

**Зонд:** 50 мкл на флакон (5 тестів), 100 мкл на флакон (10 тестів)  
Кількість зонду 13q14.3 червоного кольору: 24-30 нг / тест  
Кількість зонду 13 qter зеленого кольору: 72-90 нг / тест  
Набори зондів поставляються попередньо розчинені в гібридизаційному розчині (формамід; декстран сульфат; SSC) і готові до використання.

**Речовина для контрастного зафарбовування:** 150 мкл на флакон (15 тестів).

Речовина для контрастного зафарбовування – це DAPI, що не вигоряє, (ES: 0,125мкг / мл DAPI (4,6-діамідино-2-феніліндол)).

#### Попередження і запобіжні заходи

1. Для діагностики *in vitro*. Тільки для професійного використання.
2. Одягайте рукавички при роботі з ДНК-зондами і контрастною речовиною DAPI.
3. Суміш зондів містить формамід, який є тератогенним; не вдихайте випари або не допускайте контакту зі шкірою. Одягайте рукавички, халат і проводьте роботу під витяжною шафою. При утилізації промийте великою кількістю води.
4. DAPI є потенційним канцерогеном. Поводьтеся з обережністю; вдягайте рукавички і лабораторний халат. При утилізації промийте великою кількістю води.
5. Всі небезпечні матеріали слід утилізувати відповідно до ваших нормативів інституту по утилізації небезпечних відходів.

#### Умови зберігання та поводження

Набір слід зберігати при температурі -20°C до закінчення терміну дії, що зазначений на етикетці комплекту. Флакони із зондом і контрастною речовиною повинні зберігатися в темряві.

#### Необхідне обладнання, що не входить в комплект

1. Лабораторна термоліта (з твердою пластинною і точним регулюванням температури до 80°C).
2. Мікропіпетки змінного об'єму і наконечники в діапазоні 1 мкл - 200 мкл.
3. Водяна баня з точним контролем температури на 72°C.
4. Мікропробірки (0,5 мл).
5. Флуоресцентний мікроскоп (Будь ласка, див. розділ Рекомендації до флуоресцентного мікроскопа).
6. Пластикові або скляні контейнери Копліна.
7. Пінцет.
8. Імерсійна олія для лінз флуоресцентного мікроскопа.
9. Настільна центрифуга.
10. Предметні скельця для мікроскопа.
11. Покривні скельця 24x24 мм.
12. Таймер.
13. Інкубатор на 37°C.
14. Каучуковий клей.

#### Рекомендації до флуоресцентного мікроскопа

Для оптимальної візуалізації зонда ми рекомендуємо 100 Вт ртутну лампу і систему апохроматичних об'єктивів  $\times 63$  або  $\times 100$ . Потрійний смуговий фільтр DAPI/FITC/TexasRed є оптимальним для одночасної візуалізації всіх флуорофорів та DAPI.

#### Підготовка зразків

Набір призначений для використання на культивованих клітинах периферичної крові або культивованих клітинах кісткового мозку, що зафіксовані у фіксаторі Карнуа і готуються відповідно до лабораторних або інститутських нормативів. Сухі зразки на предметному скельці готуються у відповідності зі стандартними цитогенетичними процедурами.

#### Протокол FISH

(Примітка: Будь ласка, переконайтеся, що вплив лабораторного освітлення на зонд постійно обмежений)

#### Підготовка скельця

1. Нанесіть краплю зразка клітин на предметне скло. Дайте висохнути.
2. Занурте скельце в 2 $\times$ SSC на 2 хвилини при кімнатній температурі без перемішування.
3. Проведіть дегідратацію в серії розчинів етанолу (70%, 85% і 100%), кожен протягом 2-х хвилин при кімнатній температурі.
4. Дайте висохнути.

#### Процедура перед денатурацією

5. Вийміть зонд з холодильника і дайте йому прогрітися до кімнатної температури.
6. Переконайтеся, що розчин зонда рівномірно перемішаний дозатором.
7. Відберіть 10 мкл зонда на тест і перенесіть його в мікроцентрифужну пробірку. Швидко поверніть зонд, що залишився на -20°C.
8. Помістіть зонд і скельце із зразком на попередньо прогріту до 37°C (+/- 1°C) плитку на 5 хвилин.
9. Внесіть 10 мкл суміші зонда на зразок клітин і обережно нанесіть покривне скельце. За допомогою каучукового клею проведіть герметизацію і дайте клею повністю висохнути.

#### Денатурація

10. Денатурація зразка і зонда одночасно шляхом нагрівання предметного скельця на термоліті при 75°C (+/- 1°C) протягом 2-х хвилин.

#### Гібридизація

11. Помістіть скельце у вологу, світлонепроникну тару при температурі 37°C (+/- 1°C) на цілу ніч.

#### Промивання після гібридизації

12. Зніміть покривне скельце і ретельно витріть всі сліди клею.
13. Помістіть скельце в 0,4 $\times$ SSC (pH 7,0) при 72°C (+/- 1°C) на 2 хвилини без перемішування.
14. Вийміть скельце і занурте його в 2 $\times$ SSC, 0,05% твін-20 при кімнатній температурі (pH 7,0) на 30 секунд без перемішування.
15. Вийміть скельце і нанесіть 10 мкл DAPI на кожен зразок.

16. Накрийте покривним скельцем, видаліть всі бульбашки і дозвольте забарвленню проявитися в темряві впродовж 10 хвилин.
17. Проведіть аналіз за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

#### Стабільність готових скелець

Скельця для FISH можна аналізувати протягом 1 місяця при зберіганні в темряві нижче кімнатної температури.

#### Процедурні рекомендації

1. Пересушування або старіння скелець не рекомендується, оскільки це може призвести до зниження сигналу флуоресценції.
2. Умови гібридизації можуть шкідливо впливати на реагенти, що використовуються крім тих, які передбачені або рекомендовані компанією Cytocell Ltd.
3. Наполегливо рекомендується використовувати калібрований термометр для вимірювання температури розчинів, водяної бані, так як ці температури мають вирішальне значення для досягнення оптимальної продуктивності продукту.
4. Концентрації розчинів для промивання, pH і температура мають важливе значення, так як низькі значення можуть призвести до неспецифічного зв'язування зонда і занадто високі значення можуть призвести до відсутності сигналу.
5. Неповна денатурація може призвести до відсутності сигналу і занадто сильна денатурація може також призвести до неспецифічного зв'язування.

#### Очікувані результати.

У нормальній клітині ідентифікується два червоних і два зелених сигнали (2R, 2G). Клітина з гомозиготною делецією 13q14.3 повинна мати один червоний і два зелених сигнали (1R, 2G) в той час як клітини з гомозиготною делецією повинна мати лише два зелених сигнали (0R, 2G).

Делеції 13q у CLL розпізнаються як гетерогенні; мала делеція в межах області 13q може спричинити невеликий залишковий сигнал при використанні цього набору зондів.

#### Обмеження

Звітність та інтерпретація результатів FISH повинні відповідати професійним стандартам практики і повинна братися до уваги і інша клініко-діагностична інформація. Цей комплект призначений в якості доповнення до інших діагностичних лабораторних тестів та терапевтична дія не повинна бути розпочата на підставі одного результату FISH.

#### Бібліографія

1. Bullrich F *et al.*, Cancer Res 2001;61:6640-8
2. Zojer *et al.*, Blood 2000;95(6):1925-1930
3. Shaughnessy J *et al.*, Blood 2000;96:1505-11
4. Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
5. Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
6. Van Dyke DL *et al.*, Br J Haematology 2009;148:544-50
7. Liu Y *et al.*, Oncogene 1997;15:2463-73
8. Wolf S *et al.*, Hum Mol Genet 2001;10:1275-85
9. Liu Y *et al.*, Blood 1995;86:1911-5
10. Bullrich F *et al.*, Blood 1996;88(8):3109-15

#### Використовувані символи

<b>REF</b>	Каталожний номер
	Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i>
	Номер партії
	Ознайомлення з інструкціями для застосування
	Виробник
	Використати до
	Температурне обмеження
	Містить достатньо для (n-) випробувань
	Вміст

#### Патенти і товарні знаки

CytoCell є зареєстрованою торговою маркою компанії Cytocell Ltd.

Дата останнього перегляду інструкції із застосування:  
2021-05-26

#### Додаткова інформація

Для отримання додаткової інформації про продукт, будь ласка, зв'яжіться з відділом підтримки Cytocell Technical.



**Cytocell Ltd.**  
Oxford Gene Technology  
418 Cambridge Science Park  
Milton Road  
CAMBRIDGE  
CB4 0PZ  
UNITED KINGDOM  
T.: +44(0)1223 294048  
Ф.: +44(0)1223 294986  
E: probes@cytocell.com  
W: www.ogt.com

#### Уповноважений представник в Україні:

#### ТОВ «БІОЛАБТЕХ ЛТД»

Україна, 04213, м. Київ,  
просп. Героїв Сталінграда буд.42-А, кв.45  
Тел. +38 044 492 81 88  
Електронна адреса: info@biolabtech.com.ua

