



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika  
REF: LPS 046-S / LPS 046

## ROS1 Plus Breakapart Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Przeznaczenie

Produkt ROS1 Plus Breakapart Probe przeznaczony jest do identyfikacji, metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *in situ* Hybridisation, FISH), rearanżacji lub delecji regionu ROS1 zlokalizowanego na chromosomie 6, w regionie q22.1. Produkt jest przeznaczony do użytku na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) skrawkach tkanek lub mikromacierzach tkankowych (TMA). Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego. Produkt należy traktować jako uzupełnienie cytogenetycznych badań klinicznych.

### Informacje ogólne

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i stanowi istotne uzupełnienie klasycznych metod cytogenetycznych. Ostatnie odkrycia wskazują, że ta wartościowa technika może być obecnie wykorzystywana również do oceny próbek guzów litych pobranych w ramach biopsji i dostarczać informacji istotnych dla predykcji progresji choroby nowotworowej. Stosowane obecnie metody, takie jak badania immunohistochemiczne lub hybrydyzacja, umożliwiają uzyskanie danych na poziomie ekspresji genów. W przypadku przeprowadzania badań na skrawkach tkanek (wykonanych z użyciem kriostatów lub zatopionych w parafinie) technika FISH może jednak dostarczyć informacji na poziomie genów, *in situ*, w precyzyjnie określonym miejscu w obrębie guza. Może to ujawnić heterogeniczność między komórkami i umożliwić wykrycie małych klonów genetycznie odmiennych komórek.

### Informacje o sondzie

Gen ROS1 (*ROS proto-oncogene 1, receptor o aktywności kinazy tyrozynowej*) zlokalizowany w regionie 6q22 jest paralogiem genu ALK (receptor o aktywności kinazy tyrozynowej chłoniaka anaplastycznego), który koduje integralne białko błonowe typu I o aktywności kinazy tyrozynowej<sup>1</sup>.

Rearanżacje genu ROS1 są charakterystyczną cechą molekularną podzbioru niedrobnokomórkowego raka płuca (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) i są obserwowane u około 2% pacjentów z NSCLC<sup>2</sup>. Zidentyfikowano szereg partnerów genowych biorących udział w tych rearanżacjach, w tym geny SLC34A2, CD74 i SDC4<sup>3</sup>. Wykazano, że fuzje genu ROS1 aktywują szlaki fosfatyzacji pSTAT3, PI3K/AKT/mTOR i SHP-2<sup>4,5</sup>.

Wykazano, że pacjenci z NSCLC z rearanżacjami genu ROS1 odpowiadają na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej ALK/MET, takimi jak kryzotylib<sup>6</sup>.

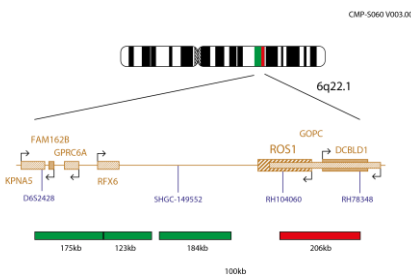
Rearanżacje genu ROS1 z partnerem genowym GOPC (*golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing*) prowadzące do fuzji były pierwotnie zgłaszane w przypadkach glejaka niedojrzałego, ale obecnie są również wykrywane w próbkach pacjentów z rakiem dróg żółciowych, rakiem jajnika i NSCLC<sup>7-9</sup>.

Konstrukt sondy ROS1 Plus obejmuje region ROS1 i region, który ulega delecji w przypadku fuzji ROS1-GOPC.

### Specyfikacja sondy

ROS1 Plus, 6q22.1, kolor zielony

ROS1 Plus, 6q22.1, kolor czerwony



Produkt ROS1 Plus Probe zawiera 3 sondy (175 kz, 123 kz, 184 kz), wyznakowane zielonym fluoroforem, umiejscowione proksymalnie względem genu ROS1 i obejmujące markery D6S2428 i SHGC-149552, oraz sondę wyznakowaną czerwonym fluoroforem (206 kz) obejmującą dystalną część genu ROS1 oraz region do markera RH78348.

### Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)

Ilość sondy ROS1 Plus wyznakowanej zielonym fluoroforem: 411–615ng/test

Ilość sondy ROS1 Plus wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 102–177ng/test

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC) i są gotowe do użycia.

Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów)

Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol)).

### Ostrzeżenia i środki ostrożności

1. Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
2. Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
3. Mieszaniny sond zawierają formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Nosić rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny i pracować pod wyciągiem. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
4. DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
5. Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucać zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.
6. Operatorzy muszą być w stanie rozróżniać czerwony, niebieski i zielony kolor.

### Przechowywanie i postępowanie z produktem

Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.

### Sprzęt wymagany, ale niedostarczany

1. Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C).
2. Mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie cieczy o różnych objętościach w zakresie 1–200 µl.
3. Łażnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72°C.
4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”).
6. Barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
7. Szczypczyki.
8. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej.
9. Wirówka laboratoryjna.
10. Szkiełka mikroskopowe.
11. Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm.
12. Stoper.
13. Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C.
14. Klej kauczukowy.
15. Zestaw Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

### Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rтęciovowej i obiektów planapochromatycznych przy powiększeniu x63 lub x100. Do jednoczesnej obserwacji zielonego i czerwonego fluoroforu oraz barwnika DAPI optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy DAPI/FITC/Texas Red. Alternatywnie do obserwacji czerwonego i zielonego fluoroforu można użyć podwójnego filtra pasmowo-przepustowego FITC/Texas Red. Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy przestrzegać zaleceń producenta dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

### Przygotowanie próbki

Zestaw zaprojektowano do użytku na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) skrawkach tkanek lub mikromacierzach tkankowych (TMA), które należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Do procedury FISH należy używać skrawków tkanek FFPE o grubości 3–5 µm.

### Wstępna obróbka próbek tkanek

Próbki tkanek należy poddać wstępnej obróbce zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. W celu uzyskania optymalnych wyników należy użyć zestawu Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

### Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy na światło w laboratorium)

### Denaturacja wstępna

- Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować próbki.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10–15 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do próbki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
- Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
- Wkropić 10–15 µl mieszaniny sond na próbkę i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczkowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

### Denaturacja

- Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 5 minut.

### Hybrydyzacja

- Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

### Płukania po hybrydyzacji

- Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
- Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10–15 µl barwnika DAPI antyfade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
- Obejrzeć pod mikroskopem fluorescencyjnym.

### Uwagi

Wydajność hybrydyzacji i morfologia tkanek zazwyczaj są ujemnie skorelowane. Agresywne procedury wstępnej obróbki (np. wydłużony czas trawienia enzymatycznego), które poprawiają wydajność hybrydyzacji, zwykle prowadzą do zniszczenia struktur komórkowych i morfologii tkanek. Łagodne procedury wstępnej obróbki, które oszczędzają strukturę tkankową, mogą jednak nie być wystarczające do penetracji sond i uzyskania akceptowalnych wyników metodą FISH.

Optymalna długość wstępnej obróbki cieplnej i czas trawienia enzymatycznego będą zależały od wieku blokca, składu tkanki i jakości utrwalenia tkanki. Czas trawienia enzymatycznego należy skrócić w przypadku próbek uzyskanych w ramach biopsji gruboigłowej oraz wszelkich skrawków, które zawierają niewiele komórek nowotworowych lub zawierają duże obszary tkanki martwiczej. Podczas pracy z takimi próbkami należy zachować szczególną ostrożność, aby nie dopuścić do nadmiernego trawienia.

### Stabilność wykonanych preparatów

Preparaty poddane procedurze FISH nadają się do analizy przez maksymalnie 1 miesiąc, o ile są przechowywane w ciemności w temperaturze poniżej 4°C.

### Zalecenia dotyczące procedury

- Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę CytoCell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
- Na potrzeby pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
- Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
- Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
- Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
- Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.

### Wyniki oczekiwane

W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa fuzyjne sygnały czerwone/zielone (2F). Oczekiwany wzorzec sygnału w komórce ze zrównoważoną rearanżacją genu ROS1 to 1 sygnał czerwony, 1 sygnał zielony i 1 sygnał fuzyjny (1C, 1Z, 1F). Delecja materiału umiejscowionego dystalnie względem genu ROS1 spowoduje utratę jednego sygnału czerwonego, a oczekiwanym wzorcem sygnału w tym przypadku będzie 1 sygnał zielony i 1 sygnał fuzyjny (1Z, 1F). W przypadku próbek aneuploidalnych/z rearanżacją niezrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału.

Uwaga: Sondy proksymalne i dystalne zawarte w produkcie LPS 046, ROS1 Plus Breakapart Probe są wyznakowane fluoroforami o przeciwnych kolorach niż sondy proksymalne i dystalne zawarte w produkcie CytoCell LPS 022, ROS1 Breakapart Probe.

### Znana reaktywność krzyżowa

Brak znanej reaktywności krzyżowej.

### Ograniczenia

Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być zgodne z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych informacji klinicznych i diagnostycznych. Zestaw ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH.

Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i jego wyniki. Ten zestaw nie został zatwierdzony do stosowania w celach innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

### Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.









Tel.: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Strona WWW: www.ogt.com

### Piśmiennictwo

- Matsushime H et al., Mol Cell Biol 1986;6:3000-4
- Bergethon K et al., J Clin Oncol 2012;30(8):863-70
- Davies KD et al., Cancer Res 2012;72(8):1538-7445
- Birchmeier C et al., Proc Natl Acad Sci 1987;84:9270-9274
- Ou SH et al., Expert Rev Anticancer Ther 2012;12(4):447-56
- Shaw, A.T. et al., 2014. 371(21), pp.1963–71.
- Gu TL et al., PLoS One 2011;6: e15640
- Charest A et al., Genes Chromosomes Cancer 2003;37:58-71
- Davies, K.D. & Doebele, R.C., 2013. Clinical cancer 19(15), pp.4040–4045

REF	PL: Numer katalogowy
	PL: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	PL: Kod partii
	PL: Zajrzyj do instrukcji używania
	PL: Wytwórca
	PL: Użyć do daty
	PL: Dopuszczalna temperatura
	PL: Zawartość wystarczająca do <n> testów
	PL: Zawartość

### Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Ltd.

Ten produkt zawiera technologię na licencji firmy Life Technologies Corporation, która jest dostępna do użytku wyłącznie na potrzeby diagnostyki człowieka lub badań z zakresu nauk przyrodniczych.

### CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, UK  
Tel.: +44(0)1223 294048  
Faks.: +44(0)1223 294986  
E: probes@cytoCELL.com  
Strona WWW: www.ogt.com

