



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPS 031-S / LPS 031

IGH/CCND1 Translocation, Dual Fusion Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

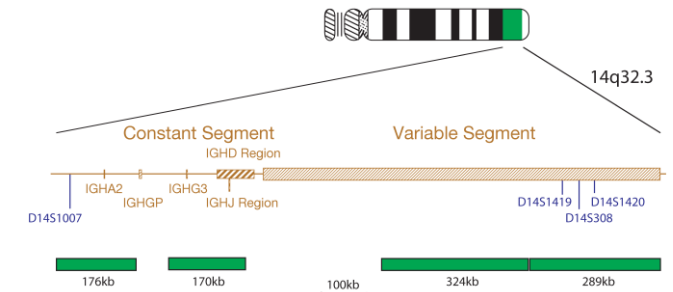
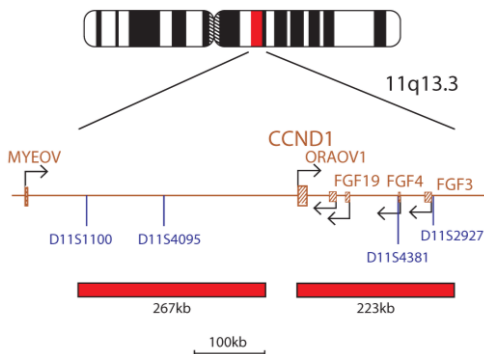
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują 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 Southerna, umożliwiają uzyskanie danych na poziomie ekspresji genów. W przypadku przeprowadzania badań na skrawkach tkanek (wykonanych z użyciem kriostatu 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

Translokacje obejmujące geny IGH i CCND1 (BCL1) były początkowo opisywane u chorych na B-CLL, jednak obecnie rearanżacje te są uznawane za cechę charakterystyczną chłoniaka z komórek płaszczą (Mantle Cell Lymphoma, MCL). Translokacje wzajemnie obejmujące loci genu IGH i genu CCND1 (nazywanego wcześniej genem BCL1), t(11;14)(q13;q32), były często obserwowane u chorych na B-CLL¹. Początkowe doniesienia na temat udziału genu CCND1 (cyklina D1) w tych translokacjach pochodziły z badań klonowania przeprowadzonych w celu odszukania miejsc złamań zaangażowanych w translokacje. Istnieje jednak prawdopodobieństwo, że początkowe rozpoznanie ustalone na próbkach użytych do badania było nieprawidłowe i powinno było wskazywać na chłoniaka MCL. Sonda IGH/CCND1 do wykrywania translokacji t(11;14) jest zalecana przez komitet British Committee for Standards in Haematology do odróżnienia pacjentów z atypowym B-CLL od pacjentów, którzy mogą mieć chłoniaka MCL².

Specyfikacja sondy

CCND1 (BCL1), 11q13.3, kolor czerwony
IGH, 14q32.33, kolor zielony



Produkt IGH/CCND1 zawiera sondy wyznakowane zielonym fluoroforem obejmujące segmenty stałe, J, D i zmienne genu IGH, a także sondy CCND1 wyznakowane czerwonym fluoroforem. Mieszanina sond CCND1 zawiera sondę o długości 267 kb położoną centromerycznie względem genu CCND1, obejmującą region między markerami D11S1100 i D11S4095, oraz drugą sondę o długości 223 kb, obejmującą telomeryczny koniec genu CCND1.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy CCND1 wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 80–100ng/test
Ilość sondy IGH wyznakowanej zielonym fluoroforem: 120–150 ng/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. Mieszanki 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 płukać dużą ilością wody.
4. DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu płukać dużą ilością wody.
5. Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucać zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.

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. Łaźnia 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. Barwniacze Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
7. Szczypczyki.
8. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektywów 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 rtęciowej i obiektywu planapochromatycznego przy powiększeniu x63 lub x100. Do jednoczesnej obserwacji wszystkich fluoroforów i 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.

Przygotowanie próbek

Ten zestaw zaprojektowano do użytku z następującymi próbkami:

- Utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (FFPE) skrawki tkanek lub mikromacierze tkankowe (TMA), należy używać skrawków tkanek o grubości 4–6 µm.
- Próbkę krwi obwodowej lub komórki szpiku kostnego z hodowli utrwalone w utrwalaczu Carnoya, suszone na powietrzu na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi.

Wszystkie próbki należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce.

Protokół FISH

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

Procedura dla próbek FFPE

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).

Denaturacja wstępna

- Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10–15 µl (odpowiednio do wielkości próbki tkanki) 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 kauczukowym 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 antifade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
- Obejrzyć pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Procedura dla krwi obwodowej lub komórek szpiku kostnego z hodowli

Przygotowanie szkiełek

- Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia.
- Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC w temperaturze pokojowej na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Odwodnić próbkę, korzystając z szeregu alkoholowego (etanol w stężeniu 70%, 85% i 100%); zanurzać szkiełko w każdym roztworze alkoholu na 2 minuty w temperaturze pokojowej.
- Pozostawić do wyschnięcia.

Denaturacja wstępna

- Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10 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 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym 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 2 minuty.

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 antifade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
- Obejrzyć 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 struktury tkankowe, 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 białka, 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

- Nie jest zalecane wypiekanie ani postarzanie preparatów zawierających próbki krwi obwodowej lub szpiku kostnego, ponieważ może to zmniejszyć fluorescencję sygnału.
- 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 zdecydowanie zalecane jest korzystanie ze 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.

Wyniki oczekiwane

W komórkach prawidłowych sondy te powinny być widoczne jako wyraźnie odgraniczone czerwone i zielone plamy, po jednej dla każdego chromosomu homologicznego (konformacja 2C, 2Z — dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone). W przypadku pacjentów z translokacją t(11;14)(q13;q32.3) oprócz czerwonych i zielonych sygnałów prawidłowych chromosomów, odpowiednio 11. i 14., powinny być obecne dwa żółte sygnały wskazujące na fuzję (1C, 1Z, 2Z — jeden sygnał czerwony, jeden sygnał zielony, dwa sygnały żółte).

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.

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@cytozell.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

- Brizard *et al.*, Leuk Lymphoma 1997;25(5-6):539-43
- Parker *et al.*, Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting; Specific disease appendix 2010, p5

	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 i jest dostępny 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