



Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

pl

Vysis LSI PML/RARA
Dual Color, Dual Fusion
Translocation Probe Set

REF 01N36-020

G28234R03

B1N36P

UWAGA: Zmiany wyróżniono kolorem szarym.

Objaśnienia użytych symboli	
	Wytwórca
REF	Numer katalogowy
LOT	Numer partii
IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Ograniczenie dopuszczalnej temperatury
	Niebezpieczeństwo
	Zagrożenia biologiczne
	Uwaga: Sprawdź w dołączonej dokumentacji.
	Zużyć do
	Zajrzyj do instrukcji używania.
EC REP	Autoryzowany przedstawiciel w krajach Wspólnoty Europejskiej

Przeznaczenie

Zestaw sond przeznaczony jest do detekcji translokacji t(15;17) (q22;q12-21), której efektem jest fuzja genów PML/RARA, metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH).

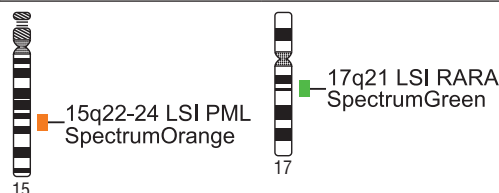
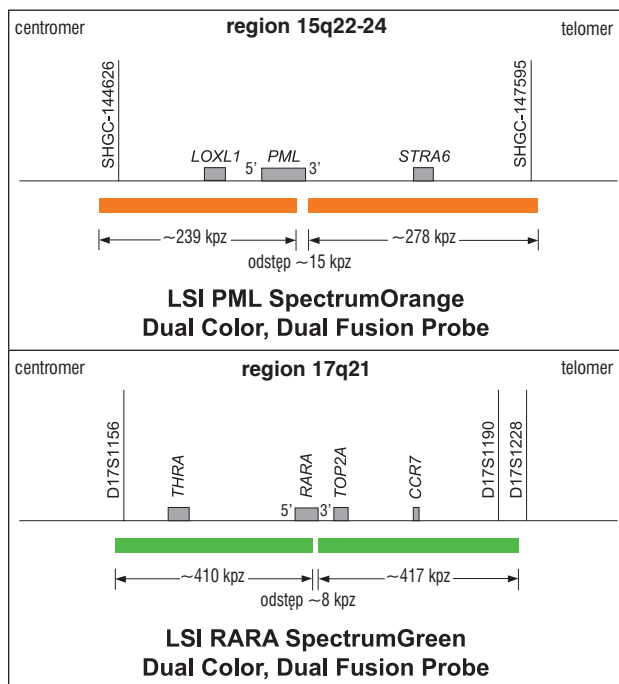
Wprowadzenie

W większości przypadków ostrej białaczki promielocytowej (ang. *acute promyelocytic leukemia*, APL) występuje translokacja t(15;17) (q22;q12-21), która powoduje fuzję genu białaczki promielocytowej (ang. *promyelocytic leukemia*, PML) na prążku chromosomu 15q22 z receptorem alfa kwasu retinowego (RARA) na chromosomie 17q12-q21.¹ Fuzja PML/RARA wiąże się z dobrą odpowiedzią na leczenie kwasem all-trans retinowym.¹

Zestaw sond LSI (ang. *Locus Specific Identifier*) PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set użyto w kilku badaniach, mających na celu detekcję fuzji PML/RARA. Brockman i wsp.² zastosowali ten zestaw sond do badania próbek szpiku kostnego pobranych od 30 osób zdrowych, od 33 pacjentów z nieleczoną białaczką APL, 14 osób z leczoną białaczką APL oraz 5 chorych na białaczkę APL o znanych wariantach translokacji. W innych opublikowanych badaniach, w tym badaniach prowadzonych przez Yina i wsp.³ oraz Moona i wsp.⁴, również wykorzystano ten zestaw sond.

Opis sondy

Zestaw sond LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set jest mieszaniną wyznakowanej na zielono (SpectrumGreen) sondy RARA i wyznakowanej na pomarańczowo (SpectrumOrange) sondy PML. Sonda LSI RARA o wielkości ok. 827 kbp pokrywa obszar genu RARA. Obszar docelowy sondy LSI PML pokrywa obszar genu PML i ma wielkość około 517 kbp. W obszarze docelowym sondy PML występuje obszar nieznakowany (odstęp) o wielkości 15 kbp.



Odczynniki

1. Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set (nr części: 30-191013)

(1 fiołka, 20 µL w jednej fiołce). 650 ng/µL, sonda DNA znakowana fluoroforem oraz blokujące DNA w Tris-EDTA.

2. Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (nr części: 30-804826)

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

Zasady przechowywania

-25°C -15°C Zestaw sond Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set należy przechowywać w temp. -20°C (±5°C) bez dostępu światła.

Warunki transportowania

Sonda Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set jest transportowana w suchym lodzie.

Jeśli stan dostarczonych odczynników jest inny niż podany na opakowaniu bądź odczynniki są uszkodzone, należy skontaktować się z Działem Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

IVD Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*

Do diagnostyki *in vitro*

Zestaw sond Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set



UWAGA: Preparat ten zawiera materiały pochodzenia ludzkiego i/lub potencjalnie zakażne składniki. Nie istnieje żadna znana metoda badawcza, która mogłaby w pełni zagwarantować, że produkty pochodzenia ludzkiego lub inaktywowane mikroorganizmy nie będą źródłem zakażenia. Z tego typu 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*,⁶ standardach OSHA dotyczących patogenów przenoszonych drogą krwi (*Standards on Bloodborne Pathogens*),⁷ w dokumencie CLSI M29-A3⁸ oraz innych odpowiednich praktyk związanych z bezpieczeństwem biologicznym.⁹ A zatem wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy traktować jako potencjalnie zakażne.

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.⁶
- Wszystkie potencjalnie zakażne materiały odkazić, a następnie usuwać zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.⁹

Bufor Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer



Niebezpieczeństwo

Składniki warunkujące stopień zagrożenia umieszczone na etykiecie: formamid

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.
P281	Stosować wymagane środki ochrony indywidualnej.
P308+P313	W PRZYPADKU narażenia lub styczości: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Usuwać produkt i jego opakowanie w bezpieczny sposób.

Oświadczenie dotyczące karty charakterystyki: Ważne informacje dotyczące bezpiecznego obchodzenia się z produktem, jego transportu i usuwania zawarte są w karcie charakterystyki.

UWAGA: Karty charakterystyki dla wszystkich odczynników zawartych w zestawie są dostępne na życzenie w Dziale Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular.

Przygotowanie odczynników

UWAGA: Tam gdzie zaznaczono, przeprowadzać pomiar pH roztworów w temperaturze otoczenia. O ile nie wskazano inaczej, należy używać pehametru 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 wynoszącej 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 wynoszącej 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 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 od 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 wynoszącej 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 (±5 °C) bez dostępu światła.

Degradacja: Fluorofory szybko ulegają degradacji pod wpływem światła. Zmniejszenie natężenia światła podczas obróbki wszystkich roztworów i preparatów zawierających fluorofory powoduje zmniejszenie tej degradacji. Wszystkie kroki, które można wykonać bez dostępu światła, takie jak inkubacje i przemywania, należy przeprowadzać w ciemności.

Uwagi dotyczące procedury: Przed użyciem odczynnik rozmrażać w temperaturze otoczenia, a następnie każdą próbkę wirować przez 2 do 3 sekund w standardowej, wysokoobrotowej mikrowirówce.

Pobranie i przygotowanie próbki do analizy

Komórki szpiku kostnego powinny zostać poddane hodowli, a następnie zbierane, utrwalane oraz umieszczane na szkiełkach mikroskopowych zgodnie z procedurami klasycznego badania cytogenetycznego.

Procedura

Wymagane materiały

- Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set
- 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 do barwienia (naczynia Coplina)
- Skalibrowany termometr
- Pęseta
- Cylinder miarowy (1000 mL)
- Mieszadło 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
- Minutnik
- Worteks
- Łaźnia wodna (37 °C i 72 °C)
- Mikroskop fluorescencyjny
- Inkubator o temp. 37 °C

- 20X SSC
- NP-40
- Formamid (o wysokim stopniu czystości)
- Barwnik kontrastowy DAPI II
- Płyta grzejna do preparatów

Przygotować 3 kominki do barwienia: Wlać 70 mL 100% etanolu do 1 kominka do barwienia, 70 mL 85% etanolu - do drugiego kominka i 70 mL 70% etanolu - do ostatniego kominka. Używać w temperaturze otoczenia. Wylać po 7 dniach lub w przypadku nadmiernego rozcieńczenia bądź wyparowania roztworu.

W celu uzyskania prawidłowych wyników 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.

Podczas wykonywania hybrydyzacji z równoczesnym użyciem sond CEP (*Chromosome Enumeration Probe*) i LSI należy postępować zgodnie z ogólną metodą stosowania sond LSI w celu ustalenia protokołu jakości dla odczynników.

Przygotowanie próbki docelowej

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

1. Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$.

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

UWAGA: W jednym kominku do barwienia nie należy zanurzać więcej niż 4 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. Dodawać poniższe składniki dla poszczególnych obszarów docelowych do próbki 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. Zmieszać 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 docelowe DNA.

UWAGA: Jeśli preparaty są już gotowe w momencie zdenaturowania sondy, można zaaplikować sondę na docelowe DNA bezpośrednio po jej denaturacji.

Hybrydyzacja 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 dla odparowania resztek etanolu.
4. Nałożyć 10 μL mieszaniny sondy na jeden docelowy region preparatu i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Powtórzyć te czynności dla kolejnych obszarów docelowych.
5. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu kleju kauczkowego.

6. Umieścić preparaty w nagrzanej 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 hybrydyzacji.

Płukanie preparatu: procedura szybkiego płukania

UWAGA: Dla próbek uzyskanych z materiału zatopionego w parafinie należy zastąpić roztwór płuczący 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 wylać.
- Wlać 70 mL 2X SSC/0,1% NP-40 do kominka do barwienia. Używać w temperaturze otoczenia. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę wylać.

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

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. Potrząsać preparatami przez 1 do 3 sekund. Powtórzyć ww. czynności z pozostałymi preparatami.
2. Wyjąć preparaty po 2 minutach.

UWAGA: Przed rozpoczęciem płukania następnych 4 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. Potrząsać preparatami przez 1 do 3 sekund. Wyjąć preparaty po upływie od 5 sekund do 1 minuty.

Wizualizacja hybrydyzacji

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 hybrydyzacji.

Użycie filtra Vysis...	pozwala na równoczesne wzbudzenie i emisję fluoroforów...
DAPI/Orange	DAPI i fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange)
DAPI/Green	DAPI i fluorofor zielony (SpectrumGreen)
Aqua/Green/Orange	fluorofor jasnoniebieski (SpectrumAqua), zielony (SpectrumGreen) oraz pomarańczowy (SpectrumOrange)
DAPI/Orange/Green	DAPI, fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange) i zielony (SpectrumGreen)
DAPI/Aqua/Green/Orange	DAPI, fluorofor jasnoniebieski (SpectrumAqua), zielony (SpectrumGreen) oraz pomarańczowy (SpectrumOrange)

Przechowywanie: Preparaty przechowywane w temp. -20°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) i chronione przed dostępem światła mogą być badane przez co najmniej 3 tygodnie po hybrydyzacji.

Zastosowanie kodenaturacji

Kodenaturacja jest procesem, który upraszcza procedurę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) poprzez połączonej, 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 hybrydyzacji.

Warunki kodenaturacji zalecane w publikacjach są zróżnicowane w zakresie temperatury i czasu, wskazując na konieczność optymalizacji tych warunków w zależności od specyficznego zastosowania oraz

typu badanej próbki. Opisane tu parametry są zalecane do użycia z aparatem *Vysis HYBrite 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. Dodawać poniższe składniki dla poszczególnych obszarów docelowych do próbki 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. Zmieszać 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

Wskazówki zamieszczone poniżej zalecane są dla aparatu *HYBrite Denaturation/Hybridization System*. W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących obsługi aparatu, patrz Instrukcja obsługi HYBrite.

Można używać również aparatu *ThermoBrite Denaturation/Hybridization System*, który pod względem termicznym jest porównywalny z aparatem HYBrite. Podczas używania aparatu ThermoBrite może być konieczna ściślejsza regulacja ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) 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.

Ograniczenia procedury

Interpretacja wyników FISH powinna być dokonana przy użyciu stosownych kontroli i technik analitycznych, biorąc pod uwagę dane z innych badań klinicznych i diagnostycznych.⁵

Każde laboratorium powinno ustalić analityczną wartość normy dla punktu odcięcia (*cut-off*) dla żądanego wzoru sygnału nieprawidłowego.

Oczekiwane rezultaty

W prawidłowych jądrach komórkowych oczekiwanym efektem hybrydyzacji do sondy LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Probe Set są 2 sygnały pomarańczowe i 2 sygnały zielone (2O2G). W jądrach obciążonych prostą fuzją t(15;17)-PML/RARA wzór znakowania charakteryzuje obecność 1 sygnału zielonego (prawidłowe allele RARA), 1 sygnału pomarańczowego (prawidłowe allele PML) oraz 2 fuzyjnych sygnałów pomarańczowo-zielonych, der(15) oraz der(17) (1O1G2F). Przy użyciu tego zestawu sond w potrójnej translokacji t(15;17;19) Brockman i wsp.² wykazali wzór 2O2G1F. Komórki z translokacją t(11;17) ujawniły wzór znakowania 2O1G2dG, gdzie dwa z trzech sygnałów zielonych (2dG) były wyraźnie mniejsze (ang. *d, diminished*). W niektórych przypadkach nieprawidłowości można zaobserwować inne wzory znakowania. Interpretacja wyników FISH powinna być dokonana przy użyciu stosownych kontroli i technik analitycznych⁵, biorąc pod uwagę dane z innych badań klinicznych i diagnostycznych.

Usuwanie problemów dotyczących wyników w teście z kodenaturacją

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

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. Jeśli będzie to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury aż do uzyskania sygnału o akceptowalnej intensywności. • 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 aż do uzyskania akceptowalnej 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: Jeśli będzie to konieczne, zredukować temperaturę lub czas denaturacji aż do 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.
Słaba 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: Jeśli będzie to konieczne, zredukować temperaturę lub czas denaturacji aż do 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 preparaty w serii płukań w etanolu (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. 5. Wysuszyć szkiełko na powietrzu i kontynuować przygotowanie preparatu do procedury kodenaturacji. • Jeśli morfologia metafaz nie poprawiła się, należy zmodyfikować użycie aparatu HYBrite: <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>HYBrite 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 aparat HYBrite osiągnie temp. 73°C, 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 niezadowolające rezultaty, jakie można uzyskać, stosując sondy LSI. Lista zawiera prawdopodobne przyczyny i zalecenia, 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 nakapki 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 próbek	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 zanurzenia preparatu w roztworze do 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 odwozić preparaty w serii płukania w etanolu (70%, 85%, 100%) kolejno po 1 minucie.
	Denaturacji poddano zbyt świeży materiał.	Pozostawić preparaty na co najmniej 24 godziny w temperaturze otoczenia, aby dojrzały.
	Silne tło widoczne na preparacie	Przed nakrapianiem zawiesiny dokładnie wyczyścić szkiełka, zanurzając je w etanolu, a następnie dokładnie wytrzeć ściereczką bezpyłową.
	Resztki komórek na preparacie	Trzykrotnie przemyć peletkę komórek świeżym utrwalcaczem i powtórzyć procedurę nakrapiania zawiesiny na szkiełko.
	Metafazy o dobrym rozproszeniu dojrzewały przez prażenie lub zawierają cytoplazmę.	Wydużyć czas zanurzenia preparatu w roztworze do denaturacji do 10 minut.
	Nieodpowiedni sposób płukania preparatów po hybrydyzacji	Upewnić się, czy roztwory płuczające 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 płuczające były używane zbyt długo lub przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Upewnić się, czy roztwory płuczające zawierające formamid są przechowywane w temp. 2 do 8°C . Wylać po upływie 7 dni lub w przypadku częstego stosowania. Wylać 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 do barwienia przed zanurzeniem preparatów wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Podnieść temperaturę roztworu denaturującego do 74°C . Wydużyć 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 Działem Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular, aby uzyskać protokoły opisujące sposób przygotowania próbek 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 odwozić preparaty w serii płukania w etanolu (70%, 85%, 100%) kolejno po 1 minucie.
	Materiał był uprzednio barwiony metodą GTG.	Użycie preparatów uprzednio barwionych do badania FISH z użyciem trypsyny i barwnika Giemsa może wymagać korekty procedury barwienia i/lub protokołu hybrydyzacji. Dalsze informacje dotyczące barwienia przed analizą FISH można uzyskać w Dziale Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular. Ewentualnie wykonać preparatykę FISH na świeżym materiale.
Sonda nie została dodana.		Przygotować nową mieszaninę sondy. Odczekać, aż sonda ulegnie całkowitemu rozmrożeniu. Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować. Powoli pipetować sondę.
	Sonda, bufor hybrydyzacyjny lub mieszanina sondy nie zostały 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 otoczenia; powoli pipetować.
	Sonda nieodpowiednio zdenaturowana UWAGA: Nie dotyczy sond dostarczonych w buforze hybrydyzacyjnym i poddanych denaturacji.	Upewnić się, czy temperatura łaźni wodnej zastosowana do denaturacji mieszaniny sondy wynosi 73 ± 1 °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% roztworu etanolu. Upewnić się, czy etanol został odparowany z preparatu przed nałożeniem sondy. Bezpośrednio po wyjęciu z łaźni wodnej o temp. 73 ± 1 °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 płuczającym; 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.)	Nieprawidłowe warunki hybrydyzacji	Upewnić się, czy zastosowano wymagany czas i temperaturę hybrydyzacji. Upewnić się, czy temperatura inkubatora wynosi 37 °C. Dobrze uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu spoiwa elastycznego, nie pozostawiając luk. Wydłużyć czas hybrydyzacji.
	Nieprawidłowe warunki płukania lub roztwory płuczające	Upewnić się, czy roztwory płuczające zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy temperatura roztworów płuczających podczas płukania była właściwa. Upewnić się, czy termometry i pHmetry są prawidłowo skalibrowane. Usunąć szkiełko nakrywkowe przed zanurzeniem preparatu w roztworze płuczającym.
	Sondy lub badane próbki były przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Nierozcieńczoną sondę przechowywać w temp. – 20 °C (± 5 °C) bez dostępu światła. Preparaty niepoddane hybrydyzacji i odwodnione przechowywać w temp. – 20 °C (± 5 °C) przez dłuższy czas, a w temperaturze otoczenia przez krótki czas. Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać w temp. – 20 °C (± 5 °C) bez dostępu światła do 3 tygodni.
	Użyto niewłaściwego barwnika kontrastowego. Barwnik kontrastowy zbyt jaskrawy	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparaty na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w serii płukań w etanolu (70%, 85%, 100%) kolejno 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 sygnały sond mogą wydawać się słabsze, jeśli ogląda się je przy użyciu filtrów wielopasmowych. Użyć filtra właściwego dla zastosowanego fluoroforu. W celu uzyskania dalszych informacji skontaktować się z Działem Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular.
	Konfiguracja mikroskopu lub obiektywów nie jest odpowiednia dla obserwacji rezultatów badania FISH lub filtry w mikroskopie są uszkodzone.	Skontaktować się z producentem mikroskopu.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Niska specyficzność sygnałów	Sondy nieprawidłowo rozcieńczone; często zbyt duża ilość sondy w oznaczeniu.	Upewnić się, czy mieszanina sond została wykonana zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania.
	Nieprawidłowe warunki hybrydyzacji	Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37 °C. Upewnić się, czy do mieszaniny sond dodano odpowiednią ilość buforu hybrydyzacyjnego.
	Zbyt niska temperatura płukania	Utrzymywać stałą temperaturę kąpeli w roztworach płuczających przez umieszczanie w jednym kominku nie więcej niż 4 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 wzmożone działanie roztworu płuczającego.
Jaskrawy lub blade barwnik kontrastowy	Barwnik kontrastowy wygląda blade: preparaty nie zostały całkowicie odwodnione przed nałożeniem barwnika lub olejek dostał się do barwnika.	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparaty na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w serii płukań w etanolu (70%, 85%, 100%) kolejno po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy.
	Niewłaściwe stężenie barwnika kontrastowego	Jeśli barwienie jest zbyt jaskrawe, przed nałożeniem na preparat rozcieńczyć barwnik roztworem przeciwdziałającym wyświecaniu (ang. <i>antifade solution</i> , nr kat. 06J29-010).
	UWAGA: Barwnik DAPI I jest 8 razy bardziej stężony niż barwnik DAPI II.	
	Barwnik kontrastowy jest przeterminowany lub był zbyt długo poddany na działanie światła.	Barwnik przechowywać w temp. – 20 °C (± 5 °C) bez dostępu światła, również podczas stosowania. Upewnić się, czy nie minęła data ważności barwnika.

Piśmiennictwo

- Grimwade D, reviewer. Br J Haematol. 1999;106:591-613. Review of: *The Pathogenesis of Acute Promyelocytic leukaemia: Evaluation of the Role of Molecular Diagnosis and Monitoring in the Management of the Disease*.
- Brockman BR, Paternoster SF, Ketterling RP, et al. New Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization Method to Detect PML/RARA Fusion in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003;145:144-151.
- Yin CC, Glassman AB, Lin P, et al. Morphologic, Cytogenetic, and Molecular Abnormalities in Therapy-Related Acute Promyelocytic Leukemia. *AM J Clin Pathol* 2005;123:840-848.
- Moon HW, Chang YH, Kim TY, et al. Incidence of Submicroscopic Deletions Vary According to Disease Entities and Chromosomal Translocations in Hematologic Malignancies: Investigation by Fluorescence In Situ Hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007;175:166-168.


- Wiktors AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med* 2006;8(1):16-23.
- US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
- US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

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>.

Zestaw sond Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set oraz inne wielokrotnie bezpośrednio znakowane sondy DNA FISH są chronione patentami amerykańskimi o nr 5663319 oraz 5491224 przyznanymi firmie Abbott Molecular. Bezpośrednio znakowane sondy fluorescencyjne LSI firmy Vysis są chronione następującymi patentami amerykańskimi: RE 40494, 6596479, 7115709, 5756696, 6280929 oraz 6607877 przyznanymi na mocy wyłącznej licencji firmie Abbott Molecular Inc. przez *The Regents of the University of California*. Metody jednoczesnego wykrywania wielu sygnałów hybrydyzacyjnych są chronione patentem amerykańskim o nr 6203977, przyznanym na mocy wyłącznej licencji firmie Abbott Molecular Inc. przez Uniwersytet Yale (*Yale University*). CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold oraz HYBrite są znakami towarowymi grupy spółek należących do firmy Abbott podlegających różnym jurysdykcjom.

ThermoBrite jest znakiem towarowym firmy Iris Sample Processing, Inc.

 Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA



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

© 2007, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
marzec 2020