

Vysis ATM/CEP 11 FISH Probe Kit

pl

Vysis ATM/CEP 11 FISH Probe Kit

REF 05N55-020

G24226R03

B5N55P

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
	Zagrożenia biologiczne
	Niebezpieczeństwo
	Uwaga: Sprawdź w dołączonej dokumentacji.
	Użyć przed
	Zajrzyj do instrukcji używania.
EC REP	Autoryzowany przedstawiciel w krajach Wspólnoty Europejskiej

Przeznaczenie

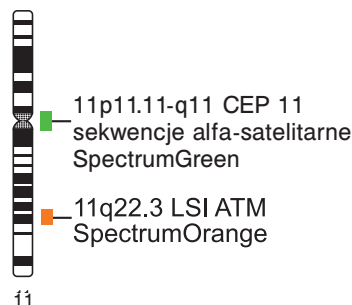
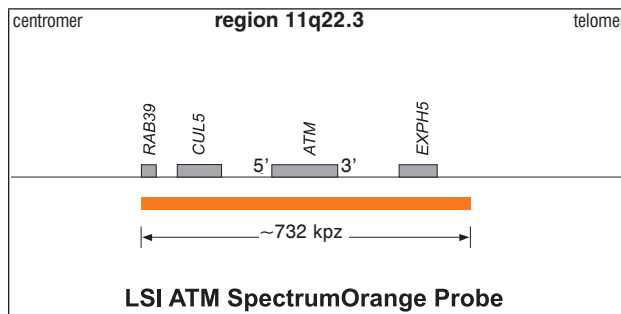
Zestaw sond Vysis ATM/CEP 11 FISH Probe Kit przeznaczony jest do wykrywania liczby kopii sekwencji docelowych sondy LSI ATM zlokalizowanych na chromosomie 11q22.3.

Wprowadzenie

Powszechnie występującą delecją w przypadkach przewlekłej białaczki limfatycznej (ang. *chronic lymphocytic leukemia*, CLL) jest utrata obszaru 11q22.¹ Utrata genu ATM w przewlekłej białaczce limfatycznej (CLL) jest związana z agresywną postacią tej choroby.² Zespół sond LSI ATM/CEP 11 został zastosowany do wykrywania utraty 11q w kilku badaniach nad przewlekłą białaczką limfatyczną (CLL).^{2,3}

Opis sondy

Wyznakowana na pomarańczowo sonda SpectrumOrange LSI ATM o wielkości około 732 kbp zawiera cały gen ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) i jest zlokalizowana na chromosomie 11q22.3 (chr11:107306249-108038407 March 2006 UCSC Browser). Wyznakowana na zielono sonda SpectrumGreen CEP 11 jest sondą kontrolną, która hybridyzuje do regionu centromerowego chromosomu 11p11.11-q11.



Odczynniki

1. Vysis LSI ATM SpectrumOrange Probe/CEP 11 SpectrumGreen Probe (nr części: 30-231059)

(1 fiołka, 20 µL w jednej fiołce). 250 ng/µL, sonda DNA znakowana fluoroforem oraz DNA blokujące w Tris-EDTA.

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

(1 fiołka, 150 µL w jednej fiołce). 250 ng/µL, siarczan dekstranu, formamid, SSC (pH 7,0).

Zasady przechowywania

-15°C Zestaw sond Vysis ATM/CEP 11 FISH Probe Kit należy przechowywać w temp. -20°C (±5°C) bez dostępu światła.

Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis ATM/CEP 11 FISH Probe Kit jest transportowany w suchym lodzie.

Jeśli stan dostarczonych odczynników jest inny niż zalecany na opakowaniu 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*

Sondy Vysis LSI ATM SpectrumOrange/CEP 11 SpectrumGreen



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 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*,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 zakaźne materiały odkazić, a następnie usunąć zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.⁸

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 u przedstawiciela 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 w 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 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 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 roztworu 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 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) z użyciem 100% etanolu w oczyszczonej wodzie. 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 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. Ograniczenie dostępu światła do wszystkich roztworów i preparatów zawierających fluorofory zmniejsza tę degradację. Wszystkie kroki, które można wykonać bez dostępu światła, takie jak inkubacje i przymywania, należy przeprowadzać w ciemności.

Uwagi dotyczące procedury: Przed użyciem wszystkie odczynniki powinny zostać rozmrożone w temperaturze otoczenia, a następnie każdą próbkę należy odwirować przez 2 do 3 sekund w standardowej, wysokoobrotowej mikrowirówce.

Pobranie i przygotowanie próbki do analizy

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

Procedura

Wymagane materiały

- Vysis LSI ATM SpectrumOrange/CEP11 SpectrumGreen Probe
- 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 (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
- Timer
- Worteks
- Łaźnia wodna (37 °C i 72 °C)
- Mikroskop fluorescencyjny

- Inkubator 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 jednego kominka do barwienia, 70 mL 85% etanolu - do drugiego kominka i 70 mL 70% etanolu - do trzeciego kominka. Używać w temperaturze otoczenia. Wylać po 7 dniach lub w przypadku nadmiernego rozcieńczenia bądź wyparowania roztworu.

W celu uzyskania optymalnych 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.

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 $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Aby utrzymać właściwą temperaturę roztworu do denaturacji, należy zanurzać 4 preparaty równocześnie. Jeśli barwionych jest mniej niż 4 preparaty, należy dołożyć pustych szkiełek o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich 4.
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. Odwozić 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 w 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 badane, 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 spodnią stronę szkiełka ręcznikiem papierowym.
3. Umieścić preparaty na płycie grzejnej o temp. 45 do 50°C na maksymalnie 2 minuty dla odparowania resztek etanolu.
4. Nałożyć 10 μL mieszaniny sondy na wybrany, docelowy region preparatu i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Powtórzyć te czynności dla kolejnych obszarów docelowych.
5. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu kleju kauczukowego.
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

UWAGA: Dla próbek uzyskanych z materiału zatopionego w parafinie należy zastąpić roztwór płuczący 2X SSC/0,3% NP-40 roztworem płuczącym 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Przygotowanie roztworów płuczących:

- Wlać 70 mL roztworu 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 roztworu 2X SSC/0,1% NP-40 do kominka do barwienia. Używać w temperaturze otoczenia. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę wylać.

UWAGA: W celu 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 płuczącego 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 preparatu, 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) i pomarańczowy (SpectrumOrange)
DAPI/Orange/Green	DAPI, fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange) i zielony (SpectrumGreen)
DAPI/Aqua/Green/Orange	DAPI, fluorofor jasnoniebieski (SpectrumAqua), zielony (SpectrumGreen) i pomarańczowy (SpectrumOrange)

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

Zastosowanie kodenaturacji

Kodenaturacja jest procesem, który upraszcza procedurę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) poprzez połączoną, jednoczesną denaturację badanej próbki i mieszaniny sondy. Zazwyczaj kodenaturacja jest przeprowadzana poprzez umieszczenie preparatów z materiałem badanym, z nałożonymi sondami i przykrytymi szkiełkami nakrywkowymi na płycie grzejnej lub w inkubatorze/suszarni, 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, w zależności od specyficznego zastosowania oraz typu badanej próbki. Podane tu parametry są zalecane do użycia z systemem *Vysis ThermoBrite 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 zastosowania 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

Podane poniżej wskazówki dotyczą parametrów wyjściowych systemu *ThermoBrite Denaturation/Hybridization System*. W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących obsługi systemu, patrz Instrukcja obsługi ThermoBrite.

Podczas pracy z systemem ThermoBrite może być konieczne dopasowanie warunków denaturacji i hybrydyzacji. Dalsze wskazania, patrz rozdział dotyczący 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 uzyskanych z parafiny 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 jej czas (*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 próbką pacjenta powinny być oznaczane kontrole: dodatnia i ujemna.

Ograniczenia stosowania

Interpretacja wyników FISH powinna być dokonana przy użyciu stosownych kontroli i technik analitycznych, a także biorąc pod uwagę inne dane kliniczne i diagnostyczne.⁴

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

Oczekiwane rezultaty

W komórce z prawidłową liczbą kopii sekwencji docelowych sond LSI ATM/CEP 11 oczekiwanym wzorem sygnałów są 2 sygnały pomarańczowe i 2 sygnały zielone. W komórce z delecją genu ATM oczekiwanym wzorem sygnałów jest 1 sygnał pomarańczowy i 2 sygnały zielone. Można też zaobserwować inne nieprawidłowe wzory sygnałów FISH, do oceny których można zastosować analizę metafaz.

Wyniki sprawiające problemy w teście z kodenaturacją

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

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. W razie potrzeby kontynuować podwyższanie temperatury aż do czasu 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 czasu 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: W razie potrzeby redukować temperaturę lub czas denaturacji aż do czasu 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.
Zła morfologia metafaz	<p>Powtórzyć analizę z kolejną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obniżyć temperaturę denaturacji o 2°C. • Skrócić czas denaturacji. <p>UWAGA: W razie potrzeby redukować temperaturę lub czas denaturacji aż do czasu 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 szkiełko w szeregu roztworów etanolu (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. 5. Wysuszyć szkiełko i kontynuować procedurę przygotowania preparatu do kodenaturacji. • Jeśli morfologia metafaz nie poprawiła się, należy zmodyfikować procedurę użycia systemu ThermoBrite: <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>ThermoBrite 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 system ThermoBrite osiągnie 73°C, należy 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 niezadowalające rezultaty, jakie można uzyskać, stosując sondy LSI. Lista zawiera prawdopodobne przyczyny i sugestie, 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 nakapowania 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 przez co najmniej 24 godziny w temperaturze otoczenia. Nie prażyć preparatów w wysokiej temperaturze.
	Nadmierna denaturacja próbki	Upewnić się, czy roztwór do denaturacji został przygotowany 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 odwodnić preparaty w serii płukań 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	Szkiełka nie były dostatecznie oczyszczone przed przygotowaniem preparatów.	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.	Wydłużyć czas zanurzenia preparatu w roztworze do denaturacji do 10 minut.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Silne tło widoczne na preparacie (c.d.)	Nieodpowiedni sposób płukania preparatów po hybrydyzacji	Upewnić się, czy roztwory płuczące zostały przygotowane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy pH i temperatura roztworów płuczających są właściwe. Usunąć szkiełko nakrywkowe. Powtórzyć procedurę płukania.
	Roztwory płuczące były używane zbyt długo lub przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Upewnić się, czy roztwory płuczące 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 szklanym przed zanurzeniem preparatów wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Podnieść temperaturę roztworu denaturującego do 74°C . Wydłużyć 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 przedstawicielem firmy Abbott Molecular, aby uzyskać protokół opisujący sposób przygotowania próbki dla procedury 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 odwodnić preparaty w serii płukań w etanolu (70%, 85%, 100%) kolejno po 1 minucie.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.)	Materiał był uprzednio barwiony dla uzyskania prążków G.	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 procedury barwienia przed analizą FISH można uzyskać u przedstawiciela firmy Abbott Molecular. Ewentualnie wykonać preparatykę FISH na świeżym materiale.
	Sonda nie została dodana.	Przygotować nową mieszaninę sondy. Pozwolić, aby sonda całkowicie się rozmroziła. Wymieszać odczynniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować. Powoli pipetować sondę.
	Sonda, bufor hybrydyzacyjny lub mieszanina sondy nie były dobrze wymieszane przed użyciem.	Wymieszać odczynniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować.
	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. Pipetować powoli.
	Sonda nieodpowiednio zdenaturowana UWAGA: Nie dotyczy sond dostarczanych w buforze hybrydyzacyjnym i poddanych denaturacji.	Upewnić się, czy temperatura łaźni wodnej zastosowana do denaturacji mieszaniny sondy wynosi 73 ± 1 °C. Denaturować mieszaninę sond przez 5 minut.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.)	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% 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 uwięzione 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.
	Nieodpowiednie warunki hybrydyzacji	Upewnić się, czy zastosowano wymagany czas i temperaturę hybrydyzacji. Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37 °C. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe za pomocą spoiwa, nie pozostawiając szpar. Wydłużyć czas hybrydyzacji.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.)	Nieprawidłowe warunki płukania lub roztwory płuczące	Upewnić się, czy roztwory płuczące zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy temperatura roztworów płuczających podczas płukania była właściwa. Upewnić się, czy termometry i pehametry są prawidłowo skalibrowane. Usunąć szkiełka nakrywkowe przed zanurzeniem preparatów w roztworze płuczającym.
	Sondy lub badane próbki były przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Nierozcieńczoną sondę należy przechowywać w temp. -20 °C (± 5 °C) bez dostępu światła. Preparaty niepoddane hybrydyzacji i odwodnione można przechowywać w temp. -20 °C (± 5 °C) przez dłuższy czas, a w temperaturze otoczenia przez krótsze okresy czasu. Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać do 3 tygodni w temp. -20 °C (± 5 °C) bez dostępu światła.
	Użyty niewłaściwy barwnik kontrastowy Zbyt jaskrawy barwnik kontrastowy	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparaty na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 w 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 sygnał sondy może wydawać się słabszy. Użyć filtra właściwego dla zastosowanego fluoroforu sondy. Dla uzyskania dalszych informacji skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular.
	Konfiguracja mikroskopu lub obiektów nie jest odpowiednia dla obserwacji rezultatów barwienia FISH lub filtry w mikroskopie są uszkodzone.	Skontaktować się z producentem mikroskopu.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Niska specyficzność sygnału	Sondy nieprawidłowo rozcieńczone; często zbyt duża ilość sondy w oznaczeniu.	Upewnić się, czy mieszanina sond została przygotowana zgodnie ze wskazówkami podanymi w instrukcji używania.
	Nieodpowiednie warunki hybrydyzacji	Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37 °C. Upewnić się, czy do mieszaniny sond dodano bufor hybrydyzacyjny i czy dodano go w odpowiedniej ilości.
	Zbyt niska temperatura płukania	Utrzymywać stałą temperaturę kąpeli w roztworach płuczających przez umieszczanie w 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 przygotowane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. UWAGA: Im niższe stężenie soli (SSC), tym wyższe stężenie formamidu i NP-40, a tym samym wzmocnione działanie roztworu płuczającego.
Jaskrawy lub błydy barwnik kontrastowy	Barwnik kontrastowy wygląda błado: próbka nie została całkowicie odwodniona przed nałożeniem barwnika lub olejek dostał się do barwnika.	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparat 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 UWAGA: Barwnik kontrastowy DAPI I jest 8 razy bardziej stężony niż barwnik DAPI II.	Jeśli barwienie DAPI jest zbyt jaskrawe, przed nałożeniem na preparat rozcieńczyć barwnik roztworem przeciwdziałającym (ang. <i>antifade solution</i> , nr kat. 06J29-010).
	Barwnik kontrastowy jest przeterminowany lub był zbyt długo poddany na działanie światła.	Barwnik przechowywać w temp. -20 °C (± 5 °C), chronić przed działaniem światła, również podczas stosowania. Upewnić się, czy nie minęła data ważności barwnika.

Piśmiennictwo

1. Shanafelt T, Geyer SM, and Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood*. 2004;103(4):1202-10.
2. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):799-804.
3. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;121:287-95.
4. Wiktor AE, Van DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.
5. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
6. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 (ISBN 1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
8. 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 ATM/CEP 11 FISH Probe Kit oraz inne bezpośrednio znakowane sondy DNA FISH objęte są patentem amerykańskim o nr 5 491 224 przyznany firmie Abbott Molecular. Bezpośrednio znakowane sondy fluorescencyjne LSI firmy Vysis są chronione następującymi patentami amerykańskimi: RE 40 494, 6 596 479, 7 115 709, 5 756 696 oraz 6 607 877 przyznanymi na mocy wyłącznej licencji firmie Abbott Molecular Inc. przez *The Regents of the University of California*.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold oraz ThermoBrite są znakami towarowymi grupy spółek należących do firmy Abbott podlegających różnym jurysdykcjom.

Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność poszczególnych firm.



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



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

© 2010, 2020 Abbott. Wszelkie prawa zastrzeżone.

www.abbottmolecular.com

maj 2020