

Vysis IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color DF FISH Probe Kit

It

Vysis IGH/MYC/CEP 8
Tri-Color DF FISH
Probe Kit

REF 04N10-020

805534R04

B4N10Y

PASTABA. Pakeitimai yra paryškinti

Simboliai	
	Gamintojas
	Katalogo numeris
	Partijos numeris
	In vitro diagnostikos medicinos priemonė
	Temperatūros ribojimas
	Pavojinga
	Biologinis pavojus
	Dėmesio. Žr. pridėtus dokumentus
	Naudoti iki
	Žr. naudojimo instrukciją
	Ilgaliotasis atstovas Europos bendrijoje

Paskirtis

Fluorescencinės *in situ* hibridizacijos žymenys Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-color Dual Fusion yra skirti t(8;14)(q24;q32) abipusei translokacijai, susijusiai su IGH ir MYC genų regionais, aptikti.

Tyrimo esmė

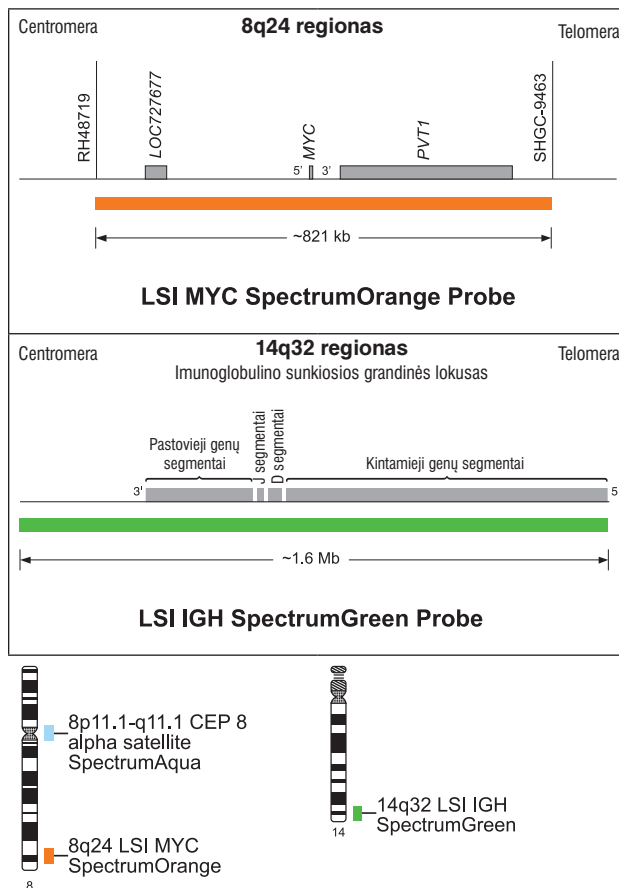
t(8;14)(q24;q32) translokacija yra Burkito (Burkitt) limfomos (BL) požymis ir pasireiškia maždaug 80% BL atvejų.¹ t(8;14)(q24;q32) translokacijos ar jos variantų tyrimas yra laikomas pagrindiniu BL tyrimu.² Žymuo Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-color Dual Fusion Probe yra naudojamas siekiant identifikuoti t(8;14)(q24;q32) translokaciją paskelbtuose straipsniuose.^{3,4} Žalsvai mėlynos spalvos CEP 8 žymuo yra naudojamas kaip 8-osios chromosomos kopijų skaičiaus kontrolinė priemonė.

Žymens aprašymas

SpectrumOrange žymuo apima apytikriai 821 kb sritį (chr8:128432540-129253747; 2006 m. kovo mėn. rinkinys)⁵ ir apima MYC geno regioną.

SpectrumAqua žymenį sudaro D8Z2 alfa satelitinės sekos ir jis yra specifinis chromosomai 8p11.1-q11.1.

Apytikriai 1.6 Mb (chr14:104736507-106339460; 2006 m. kovo mėn. rinkinys)⁵ SpectrumGreen žymuo aprėpia IGH regioną.



Reagentai

1. Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion Probes (katalogo Nr. 30-191020)

(1 buteliukas, 20 µL). 1025 ng/µL fluoroforu žymėti DNR žymenys ir blokuojamoji DNR Tris buferyje su EDTA.

2. Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (katalogo Nr. 30-804826)

(1 buteliukas, 150 µL). Dekstrano sulfatas, formamidas, SSC (pH 7.0).

Laikymo instrukcijos

-15°C Žymenų rinkinys Vysis IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color DF FISH Probe Kit turi būti laikomas -20°C (±5°C) temperatūroje ir saugomas nuo šviesos.

Gabenimo sąlygos

Žymenų rinkinys Vysis IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color DF FISH Probe Kit yra gabenamas su sausuju ledu.

Gavę etiketėje pateiktą rekomendacijų neatitinkančių arba pažeistų reagentų, kreipkitės į „Abbott Molecular“ techninės pagalbos skyrį.

Ispėjimai ir atsargumo priemonės

IVD In vitro diagnostikos medicinos priemonė

In vitro diagnostikai

Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion Probes



DĖMESIO. Šiame preparate yra žmogaus kilmės ir (arba) galimai infekcinių komponentų. Jokių žinomų tyrimo metodu negalima visiškai užtikrinti, kad per žmogaus kilmės produktus arba inaktyvintuosius mikroorganizmus nebus perduota infekcija. Šiuos reagentus ir žmogaus mėginius reikia laikyti infekciniais ir būtina naudoti saugias laboratorines procedūras, kurios yra aprašytos tokiuose leidiniuose kaip „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ (Biologinė sauga mikrobiologijos ir biomedicinos laboratorijose),⁷ OSHA (angl. *Occupational Safety and Health Administration*, Darbo saugos ir sveikatos tarnyba) standartuose dėl krauju plintančių sukėlėjų,⁸ CLSI (angl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Klinikinių ir laboratorinių standartų institutas) dokumente M29-A3,⁹ bei kitas atitinkamas biologinės saugos priemonės.¹⁰ Todėl visas žmogaus kilmės medžiagas reikia laikyti infekcinėmis.

Būtinai laikykite šią atsargumo priemonių (sąrašas nėra baigtinis):

- Naudodami mėginius arba reagentus mūvėkite pirštines.
- Nelašinkite mėginių burna.
- Nevalgykite, negerkite, nerūkykite, nenaudokite kosmetikos ir nekeiskite kontaktinių lęšių vietose, kuriose yra naudojamos šios medžiagos.
- Vietas, kuriose buvo išlieti mėginiai, valykite ir dezinfekuokite naudodami tuberkulocidinį dezinfekantą, pvz., 1.0% natrio hipochloritą arba kitą tinkamą dezinfekantą.⁷
- Visas galimai infekcines medžiagas valykite ir šalinkite vadovaudamiesi vietos, valstybės ir regioniniais reglamentais.¹⁰

Buferis Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer



Pavojinga

Etiketėje nurodomos pavojingos medžiagos: formamidai

H360	Gali pakenkti vaisingumui arba negimusiam kūdikiui.
P201	Prieš naudojimą gauti specialias instrukcijas.
P202	Nenaudoti, jeigu neperskaityti ar nesuprasti visi saugos įspėjimai.
P281	Naudoti reikalaujamas asmenines apsaugos priemones.
P308+P313	Esant sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: kreiptis į gydytoją.
P405	Laikyti užrakintą.
P501	Ši medžiaga ir jos pakuotė turi būti saugiai pašalintos.

Informacija apie saugos duomenų lapą. Saugos duomenų lape yra pateikta svarbios informacijos, kaip saugiai šį produktą naudoti, gabenti ir šalinti.

PASTABA. Visų rinkiniuose esančių reagentų medžiagos saugos duomenų lapus (angl. *Material Safety Data Sheets – MSDS*) galima gauti susisiekus su „Abbott Molecular“ techninės pagalbos skyriumi.

Reagentų ruošimas

PASTABA. Kai yra nurodyta, šių tirpalų pH matuokite aplinkos temperatūroje. Jeigu nenurodyta kitaip, naudokite pH matuoklį su stikliniu elektrodu.

20X SSC tirpalas

Kruopščiai sumaišykite 132 g 20X SSC ir 400 mL grynintojo vandens. Išmatuokite pH ir naudodami HCl koreguokite pH vertę, kad ji būtų 5.3. Įpilkite grynintojo vandens, kad galutinis tūris būtų 500 mL. Išmaišykite ir filtruokite naudodami 0.45 µm filtravimo įrenginį. Laikykite aplinkos temperatūroje. Pradinį tirpalą pašalinkite po 6 mėnesių arba anksčiau, jeigu jis yra drumstas arba užterštas.

2X SSC / 0.1% NP-40 plovimo tirpalas

Kruopščiai sumaišykite 100 mL 20X SSC tirpalo (pH 5.3) ir 850 mL grynintojo vandens. Įpilkite 1 mL NP-40. Kruopščiai maišykite, kol NP-40 visiškai ištirps. Išmatuokite pH ir naudodami NaOH koreguokite pH vertę, kad ji būtų 7.0 ± 0.2. Įpilkite grynintojo vandens, kad galutinis tūris būtų 1 litras. Išmaišykite ir filtruokite naudodami 0.45 µm filtravimo įrenginį. Laikykite aplinkos temperatūroje. Pradinį tirpalą pašalinkite po 6 mėnesių arba anksčiau, jeigu jis yra drumstas arba užterštas.

Denatūravimo tirpalas (70% formamidai / 2X SSC)

Stikliniame „Coplin“ inde kruopščiai sumaišykite 49 mL formamido, 7 mL 20X SSC tirpalo (pH 5.3) ir 14 mL grynintojo vandens. Naudodami pH matavimo juosteles patikrinkite, ar pH yra nuo 7.0 iki 8.0. Nenaudojamą tirpalą laikykite uždengtą nuo 2 iki 8 °C temperatūroje. Po 7 dienų pašalinkite.

Etanolio tirpalai (70%, 85%, 100%)

Ruošdami skirtingos tūrio koncentracijos tirpalus, 100% etanolį skieskite grynintuoju vandeniu. Nenaudojamus tirpalus laikykite uždengtus aplinkos temperatūroje. Pradinius tirpalus pašalinkite po 6 mėnesių.

2X SSC / 0.3% NP-40 plovimo tirpalas

Kruopščiai sumaišykite 100 mL 20X SSC tirpalo (pH 5.3) ir 850 mL grynintojo vandens. Įpilkite 3 mL NP-40. Kruopščiai maišykite, kol NP-40 visiškai ištirps. Išmatuokite pH ir naudodami NaOH koreguokite pH vertę, kad ji būtų nuo 7.0 iki 7.5. Įpilkite grynintojo vandens, kad galutinis tirpalo tūris būtų 1 litras. Išmaišykite ir filtruokite naudodami 0.45 µm filtravimo įrenginį. Laikykite aplinkos temperatūroje. Pradinį tirpalą pašalinkite po 6 mėnesių arba anksčiau, jeigu jis yra drumstas arba užterštas.

LSI DNR žymens laikymas. LSI DNR žymenį reikia laikyti -20 °C (± 5 °C) temperatūroje ir saugoti nuo šviesos.

Irimas. Šviesoje fluoroforai lengvai suyra ir nebešviečia. Kad to išvengtumėte, visus tirpalus ir stiklelius su fluoroforais naudokite menkai apšviestoje vietoje. Visus veiksmus, kuriems atlikti nereikia šviesos, pavyzdžiui, inkubavimą ir plovimą, atlikite tamsioje.

Su procedūromis susijusios pastabos. Prieš naudodami reagentus atitirpinkite aplinkos temperatūroje, o tada kiekvieną mėgintuvėlį nuo 2 iki 3 sekundžių centrifuguokite standartinėje stalinėje mikrocentrifugoje.

Mėginių ėmimas ir ruošimas tirti

Stiklelius reikia padengti formalinu fiksuotais į parafiną įlietais audiniais mėginiais naudojant standartines procedūras. Ruošiant į parafiną įlietus mėginius FISH tyrimui, mėginys turi būti paruoštas ir iš jo turi būti pašalintas parafinas naudojant standartines procedūras, kad būtų užtikrintas geresnis audinio pralaidumas ir hibridizacija.

Procedūra

Reikalingos medžiagos

- Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion Probe
- Buferis Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Reikalingos, bet neteikiamos medžiagos

- 12N HCl (plovimo tirpalų pH koreguoti)
- 1N NaOH (plovimo tirpalų pH koreguoti)
- Stikliniai „Coplin“ indai
- Sukalibruotas termometras
- Žnyplės
- Graduotas cilindras (1000 mL)
- Magnetinė maišyklė
- Etanolis
- Mikrocentrifuga
- Nuo 1 iki 10 µL tūrio mikrolitrinių pipetų antgaliai
- Nuo 1 iki 10 µL tūrio mikrolitrinis pipetorius
- pH matuoklis
- Nuvalyti mikroskopiniai stikleliai
- Grynintasis vanduo
- Laikmatis
- Sūkurinis maišytuvas
- Vandens vonelė (37 °C ir 72 °C temperatūros)
- Fluorescencinis mikroskopas
- 37 °C temperatūros inkubatorius
- 20X SSC
- NP-40
- Formamidai, ypač grynas
- DAPI II kontrastiniai dažai
- Stiklelių šildytuvas

3 „Coplin“ indų ruošimas. Į 1 indą įpilkite 70 mL 100% etanolio, į kitą indą įpilkite 70 mL 85% etanolio, o į paskutinį – 70 mL 70% etanolio. Naudokite aplinkos temperatūroje. Po 7 dienų arba per daug praskiestą ar išgaravusį tirpalą pašalinkite.

Optimaliems rezultatams pasiekti reagentai turi būti ruošiami ir naudojami šiame pakuotės lapelyje nurodytoje temperatūroje. Išmatuokite „Coplin“ induose esančių tirpalų temperatūrą; reikia naudoti sukalibruotą termometrą.

Mėginio taikinio ruošimas

PASTABA. „Coplin“ indams su denatūravimo tirpalu leiskite sušilti iki aplinkos temperatūros. Kad tirpalas sušiltų iki reikiamos temperatūros, indus apytikriai 30 minučių palaikykite 73 ± 1 °C temperatūros vandens vonelėje.

- Įsitikinkite, kad denatūravimo tirpalo temperatūra yra 73 ± 1 °C. Kad būtų palaikoma tinkama denatūravimo tirpalo temperatūra, vienu metu pamerkite 4 stiklelius. Jeigu turite mažiau nei 4 stiklelius, naudokite tuščius aplinkos temperatūros stiklelius, kad jų iš viso būtų 4.

- Stiklelius 5 minutėms pamerkite į denatūravimo tirpalą.

PASTABA. Vienu metu į „Coplin“ indą merkite ne daugiau kaip 4 stiklelius.

- Stiklelius dehidratuokite 1 minutei pamerkdami juos į 70% etanolį, paskui 1 minutei pamerkdami į 85% etanolį, ir 1 minutei – į 100% etanolį.

PASTABA. Stiklelius 100% etanolyje laikykite tol, kol būsité pasirengę visus stiklelius nusausti ir užlašinti žymenų mišinio.

Žymenų mišinio ruošimas

- Kiekvienai taikinio sričiai aplinkos temperatūroje į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį įpilkite:

- 7 µL LSI/WCP hibridizacijos buferio
- 1 µL žymens
- 2 µL grynintojo vandens

PASTABA. Kad vienu metu galėtumėte hibridizuoti iki 3 žymenų, kiekvieną pažymėtą skirtingu fluoroforu, įpilkite po 1 µL kiekvieno žymens. Įpilkite grynintojo vandens, kad bendras žymenų ir vandens tūris būtų 3 µL.

- Mėgintuvėlius centrifuguokite nuo 1 iki 3 sekundžių.
- Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu ir dar kartą centrifuguokite.
- Mėgintuvėlius 5 minutėms įdėkite į 73 ± 1 °C temperatūros vandens vonelę.
- Išimkite mėgintuvėlius iš vandens vonelės.
- Padėkite mėgintuvėlius ant nuo 45 iki 50 °C temperatūros stiklelių šildytuvo, kol būsité pasirengę sumaišyti žymenį su taikinio DNR.

PASTABA. Jeigu stikleliai yra paruošti, o žymuo yra denatūruotas, žymenį galite iš karto sumaišyti su taikinio DNR.

Žymens ir mėginio taikinio hibridizacija

PASTABA. Paruoškite sudrėkintą kamerą ant sandarios talpyklos šono uždėdami vandeniu suvilgytą popierinį rankšluostį. Įdėkite į 37 °C temperatūros inkubatorių.

- Išimkite stiklelius iš 100% etanolio.
- Nusausinkite stiklelius apatinį jų kraštą prieliesdami prie sugeriamojo popieriaus, o apatinę jų pusę nusausindami popieriniu rankšluosčiu.
- Padėkite stiklelius ant nuo 45 iki 50 °C temperatūros stiklelių šildytuvo, kad išgaruotų likęs etanolis.
- Ant 1 taikinio srities užlašinkite 10 µL žymenų mišinio ir nedelsdami uždėkite dengiamąjį stiklį. Pakartokite procedūrą su kitomis taikinių sritimis.
- Užklijuokite dengiamuosius stiklelius kaučiukiniais kljais.
- Sudėkite stiklelius į pašildytą sudrėkintą kamerą, kurią nuo 6 iki 16 valandų įdėkite į 37 °C temperatūros inkubatorių.

Kad tyrimo signalas būtų pakankamai stiprus, daugumai LSI žymenų reikės atlikti nuo 12 iki 16 valandų trukmės hibridizaciją.

Stiklelių plovimas

Plovimo tirpalų ruošimas:

- Į „Coplin“ indą įpilkite 70 mL 2X SSC / 0.3% NP-40. Prieš naudodami indą mažiausiai 30 minučių įdėkite į 73 ± 1 °C temperatūros vandens vonelę. Naudokite 1 dieną, tada pašalinkite.
- Į „Coplin“ indą įpilkite 70 mL 2X SSC / 0.1% NP-40. Naudokite aplinkos temperatūroje. Naudokite 1 dieną, tada pašalinkite.

PASTABA. Kad būtų palaikoma tinkama 2X SSC / 0.3% NP-40 temperatūra, vienu metu plaukite 4 stiklelius. Jeigu turite mažiau nei 4 stiklelius, naudokite tuščius aplinkos temperatūros stiklelius, kad jų iš viso būtų 4.

Laiką pradėkite skaičiuoti nuo momento, kai bus pamerktas ketvirtasis stiklis.

- Nuo 1 stiklelio pašalinkite kaučiukinius kljais, stengdamiesi kuo įmanoma mažiau judinti dengiamąjį stiklį, ir pamerkite stiklį į 2X SSC / 0.1% NP-40. Pakartokite procedūrą su kitais stikleliais ir palaukite nuo 2 iki 5 minučių, kad dengiamieji stikleliai nuslystų nuo stiklelių.

- Pamerkite stiklį į 2X SSC / 0.3% NP-40. Maišykite stiklelius nuo 1 iki 3 sekundžių. Pakartokite procedūrą su kitais stikleliais.

- Po 2 minučių stiklelius ištraukite.

PASTABA. Prieš plaudami kitus 4 stiklelius įsitikinkite, kad plovimo tirpalo temperatūra yra 73 ± 1 °C.

- Pamerkite stiklelius į 2X SSC / 0.1% NP-40. Maišykite stiklelius nuo 1 iki 3 sekundžių. Ištraukite stiklelius praėjus nuo 5 sekundžių iki 1 minutės.

Hibridizacijos rezultato stebėjimas

- Leiskite stikleliams išdžiūti natūraliai tamsoje.
- Užlašinkite 10 µL DAPI II kontrastinių dažų ant stiklelio taikinio srities ir uždėkite dengiamąjį stiklį.

Apžiūrėkite stiklelius naudodami optimaliai veikiantį fluorescencinį mikroskopą ir tinkamą filtrų rinkinį. Toliau nurodyti optinių filtrų rinkiniai yra tinkami norint matyti hibridizacijai naudotus fluoroforus.

Naudojant šį Vysis filtrą...	Vienu metu yra sužadinama ir sukeliamas šių fluoroforų emisija...
DAPI/Orange	DAPI ir SpectrumOrange fluoroforų
DAPI/Green	DAPI ir SpectrumGreen fluoroforų
Aqua/Green/Orange	SpectrumAqua, SpectrumGreen ir SpectrumOrange fluoroforų
DAPI/Orange/Green	DAPI, SpectrumOrange ir SpectrumGreen fluoroforų
DAPI/Aqua/Green/Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen ir SpectrumOrange fluoroforų

Laikymas. Stiklelius, laikomus -20 °C (± 5 °C) temperatūroje ir saugomus nuo šviesos, galima tirti mažiausiai 3 savaites po hibridizacijos.

Kodenatūravimo taikymas

Kodenatūravimas yra procesas, supaprastinantis FISH tyrimą, nes žymenų mišinio ir mėginio denatūravimas vyksta vienu etapu. Paprastai kodenatūravimas yra atliekamas, kai stikleliai su mėginiais, žymenimis ir dengiamaisiais stikleliais yra padedami ant denatūravimo temperatūros kaitinimo plokštės arba krosnies ar inkubatoriaus lentynėlės. Praėjus nuo 2 iki 10 minučių stikleliai paprastai yra išimami ir sudedami į hibridizacijos temperatūros inkubatorių.

Paskelbtose kodenatūravimo sąlygose yra nurodomi įvairūs temperatūrų ir laiko intervalai. Tai reiškia, kad sąlygos turi būti optimizuojamos atsižvelgiant į konkrečius poreikius ir mėginių tipus. Čia aprašyti parametrai yra taikomi sistemai Vysis ThermoBrite Denaturation/Hybridization System ir turi būti laikomi pradiniais parametrais. Juos gali reikėti optimizuoti atsižvelgiant į mėginį. Hibridizacijos vaizdas atliekant kodenatūravimą gali skirtis nuo hibridizacijos vaizdo, kai mėginio taikinyje yra denatūruojamas ir dehidratuojamas prieš lašinant žymenį.

Stiklelių ruošimas kodenatūravimo procedūrai

- Kiekvienai taikinio sričiai aplinkos temperatūroje į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį įpilkite:

- 7 µL LSI/WCP hibridizacijos buferio
- 1 µL žymens
- 2 µL grynintojo vandens

PASTABA. Kad vienu metu galėtumėte hibridizuoti iki 3 žymenų, kiekvieną pažymėtą skirtingu fluoroforu, įpilkite po 1 µL kiekvieno žymens. Įpilkite grynintojo vandens, kad bendras žymenų ir vandens tūris būtų 3 µL.

- Mėgintuvėlius centrifuguokite nuo 1 iki 3 sekundžių.
- Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu ir dar kartą centrifuguokite.
- Ant stiklelio užlašinkite 10 µL žymenų mišinio ir nedelsdami uždėkite dengiamąjį stiklį.
- Užklijuokite dengiamuosius stiklelius kaučiukiniais kljais.

Denatūravimo / hibridizacijos sistemos parametrų nustatymas

Toliau pateikti nurodymai turi būti laikomi sistemos ThermoBrite Denaturation/Hybridization System pradiniais parametrais. Daugiau informacijos apie tai, kaip naudoti šį instrumentą, yra pateikta ThermoBrite naudojimo vadove.

Naudojant ThermoBrite sistemą gali reikėti pakoreguoti denatūravimo ir hibridizacijos sąlygas. Daugiau rekomendacijų yra pateikta šio pakuotės lapelio dalyje apie trikčių šalinimą.

1. Limfocitų ir kaulų čiulpų ląstelių kultūroms nustatykite 73 °C lydymosi temperatūrą („Melt Temp“) ir 1 minutės lydymosi laiką („Melt Time“). Į parafiną įlietiems mėginiams nustatykite 73 °C lydymosi temperatūrą („Melt Temp“) ir 5 minučių lydymosi laiką („Melt Time“).
2. Nustatykite 37 °C hibridizacijos temperatūrą („Hyb Temp“) ir hibridizacijos laiką („Hyb Time“) nuo 4 valandų iki per naktį.
3. Baigę hibridizaciją nuplaukite stiklelius atlikdami greitojo plovimo procedūrą.
4. Leiskite stikleliams išdžiūti natūraliai tamsoje.
5. Ant taikinio srities užlašinkite 10 µL kontrastinių dažų ir uždėkite dengiamąjį stiklį.

Kokybės kontrolės procedūros

Pacientų mėginiai turi būti tiriami kartu su teigiamomis ir neigiamomis kontrolėmis.

Naudojimo apribojimai

Naudojimui interfazėje atskiros laboratorijos turi nustatyti atitinkamo patologinio signalo modelio analitinę normaliąją skiriamąją ribą.⁶

Numanomi rezultatai

Naudojant žymenis Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-color Dual Fusion Probes, numanomas normalių signalų modelis yra 2 oranžiniai, 1 žalias ir 2 žalsvai mėlyni signalai.

Naudojant žymenis Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-color Dual Fusion Probes, numanomas patologinių signalų modelis yra 1 oranžinis, 1 žalias, 2 susiliejimo ir 2 žalsvai mėlyni signalai. Žalsvai mėlynos spalvos CEP 8 žymuo yra naudojamas kaip 8-osios chromosomos kopijų skaičiaus kontrolinė priemonė. Gali būti gauti ir kitokie patologinių signalų modeliai, kurie gali būti analizuojami atliekant metafazės analizę.

Kodenatūravimo tyrimo rezultatų trikčių šalinimas

Hibridizacijos, kuriai yra taikomas kodenatūravimas, atveju stebima chromosomų morfologija gali skirtis nuo mėginio, kuris prieš lašinant žymenį buvo denatūruotas ir dehidratuotas.

Problema	Galimas sprendimas
Kryžminė hibridizacija	Pakartokite tyrimą su nauju mėginiu, atlikdami 1 iš toliau aprašytų veiksmų: • 2 °C padidinkite 2X SSC / 0.3% NP-40 temperatūrą. Didinkite temperatūrą, kol signalo intensyvumas bus priimtinas. • 2 °C sumažinkite lydymosi temperatūrą.
Neryškus žymuo	Pakartokite tyrimą su nauju mėginiu, atlikdami 1 iš toliau aprašytų veiksmų: • Pailginkite hibridizacijos laiką. • Padidinkite lydymosi temperatūrą. Didinkite temperatūrą, kol morfologija bus priimtina. • Plaukite stiklį naudodami nuo 70 iki 73 °C temperatūros 2X SSC / 0.3% NP-40.
Difuzinis signalas (dėmėtis)	Pakartokite hibridizaciją, atlikdami 1 iš toliau aprašytų veiksmų: • 2 °C sumažinkite lydymosi temperatūrą. • Sutrumpinkite lydymosi laiką. PASTABA. Mažinkite lydymosi temperatūrą arba laiką, kol signalo intensyvumas bus priimtinas. • Plaukite naudodami nuo 73 iki 76 °C temperatūros 2X SSC / 0.3% NP-40.

Problema	Galimas sprendimas
Neryški metafazės morfologija	Pakartokite tyrimą su nauju mėginiu, atlikdami 1 iš toliau aprašytų veiksmų: • 2 °C sumažinkite lydymosi temperatūrą. • Sutrumpinkite lydymosi laiką. PASTABA. Mažinkite lydymosi temperatūrą arba laiką, kol signalo intensyvumas bus priimtinas. • Iš anksto paruoškite stiklelius: 1. Paruoškite 2X SSC / 1% paraformaldehido tirpalą. 2. Stiklį 1 minutei pamerkite į 2X SSC / 1% paraformaldehido tirpalą. 3. Stiklį kelis kartus įmerkite į grynintąjį vandenį. 4. Stiklelius dehidratuokite atlikdami 1 minutės trukmės skalavimo etanolio (70%, 85%, 100%) procedūras. 5. Leiskite stikleliams natūraliai išdžiūti ir atlikite procedūrą Stiklelio ruošimas kodenatūravimo procedūrai.
Neryški metafazės morfologija	• Jeigu morfologija vis tiek neišryškėja, pakoreguokite ThermoBrite instrumento naudojimą: 1. Paruoškite 280 µL 70% formamido / 2X SSC denatūravimo tirpalą (196 µL formamido / 28 µL 2X SSC / 56 µL grynintojo vandens). 2. Nustatykite 73 °C temperatūros ThermoBrite programą „Hold Temp“. 3. Ant kiekvienos taikinio srities užlašinkite 10 µL 70% formamido / 2X SSC denatūravimo tirpalo ir uždėkite dengiamąjį stiklį. 4. Kai ThermoBrite pasieks 73 °C temperatūrą, padėkite stiklelius ant šildomo paviršiaus. Uždarykite dangtį. 5. Po 3 minučių stiklelius išimkite. 6. Nuimkite dengiamuosius stiklelius. 7. Atlikite dehidratavimo veiksmą, aprašytą dalyje Mėginio taikinio ruošimas, taikomą tyrimui be kodenatūravimo.

Patarimai ir trikčių šalinimas

Peržiūrėdami FISH tyrimo rezultatus įsitikinkite, kad mikroskopas yra tinkamai suderintas ir optimaliai veikia.

Toliau lentelėje yra pateikti kai kurie neoptimalūs rezultatai, kuriuos galima gauti naudojant LSI žymenis. Taip pat yra pateiktos galimos priežastys bei rekomendacijos, kaip pagerinti tyrimo veikimą.

Problema	Galima priežastis	Galimas sprendimas
Deformuota chromosomos morfologija	Ruošiami stikleliai su mėginiais per greitai išdžiūvo.	Padidinkite vandens vonelės, į kurią yra merkami stikleliai, temperatūrą (kad padidėtų drėgmė). Ruošdami mėginius sumažinkite stiklelių šildytuvo temperatūrą. Pailginkite džiovinimo laiką bent jau iki džiovinimo per naktį aplinkos temperatūroje ir palikite stiklelius mažiausiai 24 valandoms aplinkos temperatūroje. Nekaitinkite stiklelių aukštoje temperatūroje.

Problema	Galima priežastis	Galimas sprendimas
	Mėginys yra per daug denatūruotas.	Įsitikinkite, kad denatūravimo tirpalas buvo paruoštas vadovaujantis pakuotės lapelyje pateiktais nurodymais. Įsitikinkite, kad prieš merkant stiklį denatūravimo tirpalo temperatūra yra 73 ± 1 °C; sumažinkite temperatūrą iki 72 °C. Sutrupinkite stiklio mirkymo denatūravimo tirpale laiką nuo 1 iki 3 minučių.
	Prieš merkant į denatūravimo tirpalą stikliai su mėginiais buvo nepakankamai išdžiūvę.	Prieš denatūravimą sušildykite stiklelius su mėginiais iki nuo 45 iki 50 °C temperatūros arba dehidratuokite atlikdami 1 minutės trukmės skalavimo etanolio (70%, 85%, 100%) procedūras.
	Prieš denatūravimą stikliai su mėginiais buvo per daug švieži.	Palikite stiklelius mažiausiai 24 valandoms aplinkos temperatūroje.
Ryškus stiklio fonas	Prieš ruošiant mėginius stikliai buvo nepakankamai gerai nuvalyti. Ruošiant mėginį pasitaikė ląstelių liekanų.	Pamerkite stiklelius į etanolį, o prieš lašindami ant stiklelių nusauskinkite juos nesipūkuojančiu popieriumi. Ląstelių liekanas 3 kartus nuplaukite šviežiu fiksavimo tirpalu ir pakartokite lašinimą ant stiklelių procedūrą.
	Metafazinės ląstelės buvo subrandintos kaitinant arba jose yra citoplazmos.	Pailginkite stiklio mirkymo denatūravimo tirpale laiką iki 10 minučių.
Ryškus stiklio fonas	Po hibridizacijos stiklis buvo nepakankamai gerai nuplautas.	Įsitikinkite, kad plovimo tirpalai buvo paruošti vadovaujantis pakuotės lapelyje pateiktais nurodymais. Įsitikinkite, kad plovimo tirpalų pH ir temperatūra yra tinkami. Nuimkite dengiamuosius stiklelius. Pakartokite plovimo procedūrą.
	Plovimo tirpalai buvo per ilgai naudojami arba netinkamai laikomi.	Įsitikinkite, kad plovimo tirpalai, kuriuose yra formamido, yra laikomi nuo 2 iki 8 °C temperatūroje. Pašalinkite tirpalus po 7 dienų arba jeigu jie yra dažnai naudojami. Po 1 dienos pašalinkite visus kitus plovimo tirpalus. Įsitikinkite, kad plovimo tirpalų su formamidu pH yra nuo 7.0 iki 8.0.
	Hibridizacijos peržiūrai buvo naudojami ilgųjų bangų filtrai.	Norėdami sumažinti foninę šviesą naudokite mažesnio bangos ilgio filtrus arba skirtingų ilgių bangų filtrus.
Silpnas signalas arba jokio signalo	Stiklis su mėginiu buvo nepakankamai denatūruotas.	Įsitikinkite, kad denatūravimo tirpalo „Coplin“ inde temperatūra prieš merkant stiklį yra 73 ± 1 °C. Padidinkite denatūravimo tirpalo temperatūrą iki 74 °C. Pailginkite stiklio mirkymo denatūravimo tirpale laiką nuo 2 iki 4 minučių.
	Stiklis su mėginiu buvo netinkamai paruoštas FISH tyrimui.	Kreipkitės į „Abbott Molecular“ techninės pagalbos skyrių dėl mėginių ruošimo FISH tyrimui protokolą.

Problema	Galima priežastis	Galimas sprendimas
	Užlašinus mėginius, stikliai su mėginiais buvo netinkamai brandinami.	Prieš tiriant stiklelius su mėginiais FISH tyrimo metodu juos reikia palikti 24 valandoms aplinkos temperatūroje.
	Prieš merkant į denatūravimo tirpalą stikliai su mėginiais buvo nepakankamai išdžiūvę.	Prieš denatūravimą sušildykite stiklelius su mėginiais iki nuo 45 iki 50 °C temperatūros arba dehidratuokite atlikdami 1 minutės trukmės skalavimo etanolio (70%, 85%, 100%) procedūras.
	Mėginys buvo žymėtas GTG.	FISH tyrimui naudojant tripsiną ir Giemsa dažais žymėtus mėginius gali reikėti pakoreguoti žymėjimo ir (arba) hibridizacijos protokolus. Dėl papildomos informacijos apie žymėjimą prieš atliekant FISH tyrimą kreipkitės į „Abbott Molecular“ techninės pagalbos skyrių arba paruoškite stiklelius su šviežiais mėginiais.
	Žymuo nebuvo užlašintas.	Paruoškite naują žymenų mišinį. Leiskite žymeniui visiškai atitirpti. Išmaišykite reagentus sukuriniu maišytuvu arba pipete; trumpai centrifuguokite. Lėtai užlašinkite žymenį pipete.
	Prieš naudojant žymuo, hibridizacijos buferis arba žymenų mišinys nebuvo gerai išmaišytas.	Išmaišykite reagentus sukuriniu maišytuvu arba pipete; trumpai centrifuguokite.
	Hibridizacijai naudojami žymenys buvo netinkamai atskiesti.	Naudokite tyrimo procedūroje nurodytus tūrius, kad išlaikytumėte žymenų mišinio santykį (7 µL hibridizacijos buferio: 1 µL žymens: 2 µL grynojo vandens). Įsitikinkite, kad pipetė yra sukalibruota. Prieš naudodami hibridizacijos buferį leiskite jam visiškai atitirpti ir sušilti iki aplinkos temperatūros; lėtai išpilstykite pipete.
Silpnas signalas arba jokio signalo	Žymuo buvo nepakankamai denatūruotas. PASTABA. Netaikytina žymenims, kurie yra tiekami hibridizacijos buferyje ir yra denatūruoti.	Įsitikinkite, kad denatūruojant žymenų mišinį naudojamos vandens vonelės temperatūra yra 73 ± 1 °C. Denatūruokite žymenų mišinį 5 minutes.

Problema	Galima priežastis	Galimas sprendimas
	Žymuo nebuvo užlašintas ant mėginio taikinio iš karto po žymens denatūravimo.	Darbą planuokite taip, kad žymuo būtų užlašintas iš karto po to, kai stikleliai yra išimami iš 100% etanolio tirpalo. Įsitikinkite, kad prieš lašinant žymenį etanolis yra išgaravęs. Išimkite mėgintuvėlį su žymenų mišiniu iš 73 ± 1 °C temperatūros vandens vonelės ir iš karto padėkite mėgintuvėlį ant nuo 45 iki 50 °C temperatūros stiklelių šildytuvo. Lašindami žymenį pipete ant stiklelio mėgintuvėlį laikykite ant stiklelių šildytuvo. Ruoškite tik tiek stiklelių, kiek galite, ir būtinai laikykitės tyrimo procedūroje nurodytą tinkamos temperatūros bei laiko reikalavimų.
	Žymenų mišinys ant stiklelio su mėginiu yra per daug išdžiūvęs.	Užlašinę žymenų mišinio, ant taikinio srities iš karto uždėkite dengiamąjį stiklį. Plaudami po hibridizacijos, pirmiausia nuimkite dengiamąjį stiklį nuo 1 stiklelio, iš karto įmerkite stiklį į plovimo tirpalą ir tik tada nuimkite dengiamąjį stiklį nuo kito stiklelio.
	Vykstant hibridizacijai po dengiamuoju stikleliu susidarė oro burbuliukų.	Dėdami dengiamąjį stiklį pirmiausia prilieskite žymenų mišinio paviršių. Padėkite stiklį dengiamuoju stikleliu žemyn ant sugeriamojo popieriaus ir labai švelniai išspauskite matomus burbuliukus.
	Hibridizacijos sąlygos yra netinkamos.	Įsitikinkite, kad buvo laikomasi nurodytą hibridizacijos laiko ir temperatūros reikalavimų. Įsitikinkite, kad inkubatoriaus temperatūra yra 37 °C. Pritvirtinkite dengiamąjį stiklį kaučiukiniais klijais, kad neliktų jokių tarpų. Paiginkite hibridizacijos laiką.
	Plovimo sąlygos arba tirpalai yra netinkami.	Įsitikinkite, kad plovimo tirpalai buvo paruošti vadovaujantis pakuotės lapelyje pateiktais nurodymais. Įsitikinkite, kad plovimo tirpalų temperatūra atitinka plovimo procedūrai nustatytą temperatūrą. Įsitikinkite, kad naudojami termometrai ir pH matuokliai yra tinkamai sukalibruoti.
	Žymenys arba stikleliai su mėginiais buvo netinkamai laikomi.	Prieš merkdami stiklelius į plovimo tirpalą nuo jų nuimkite dengiamuosius stiklelius. Neskiestą žymenį laikykite -20 °C (± 5 °C) temperatūroje ir saugokite nuo šviesos. Nehibridizuotus stiklelius laikykite sausoje vietoje -20 °C (± 5 °C) temperatūroje ilgesnį laiką arba aplinkos temperatūroje trumpesnį laiką. Hibridizuotus stiklelius laikykite -20 °C (± 5 °C) temperatūroje ir saugokite nuo šviesos iki 3 savaičių.

Problema	Galima priežastis	Galimas sprendimas
Silpnas signalas arba jokio signalo	Naudojami kontrastiniai dažai yra netinkami. Kontrastiniai dažai yra per šviesūs.	Nuimkite dengiamuosius stiklelius. 5 minutėms pamerkite stiklelius į aplinkos temperatūros 2X SSC / 0.1% NP-40; stiklelius dehidratuokite atlikdami 1 minutės trukmės skalavimo etanolio (70%, 85%, 100%) procedūras. Natūraliai išdžiovinkite ir pakartokite kontrastinį dažymą.
	Hibridizacijai peržiūrėti buvo naudojamas netinkamas filtrų rinkinys.	Skirtingų bangų ilgių filtrų rinkiniai praleidžia mažiau šviesos nei vieno bangos ilgio filtrų rinkiniai, todėl naudojant skirtingų bangų ilgių filtrų rinkinius žymenų signalai gali būti silpnesni. Žymenų fluoroformas stebėti naudokite tinkamą filtrą. Dėl papildomos informacijos kreipkitės į „Abbott Molecular“ techninės pagalbos skyrių.
	Mikroskopo konfigūracija ar objektyvai netinka FISH tyrimo rezultatų peržiūrai arba mikroskopo filtrai yra pažeisti.	Kreipkitės į mikroskopo gamintoją.
Mažas signalų specifiškumas	Žymenys buvo netinkamai praskiesti; tyrimui naudojamo žymens kiekis yra per didelis.	Įsitikinkite, kad žymenų mišinys buvo paruoštas vadovaujantis pakuotės lapelyje pateiktais nurodymais.
	Hibridizacijos sąlygos yra netinkamos.	Įsitikinkite, kad inkubatoriaus temperatūra yra 37 °C. Įsitikinkite, kad į žymenų mišinį buvo įlašintas reikiamas kiekis hibridizacijos buferio.
	Plovimo temperatūra yra per žema.	Siekdami palaikyti plovimo tirpalų temperatūrą, į 1 „Coplin“ indą vienu metu dėkite ne daugiau kaip 4 stiklelius, o prieš plaudami kitą stiklelių rinkinį įsitikinkite, kad plovimo tirpalo temperatūra yra tinkama.
	Plovimo tirpalai yra nepakankamo stiprumo.	Įsitikinkite, kad plovimo tirpalai buvo paruošti vadovaujantis pakuotės lapelyje pateiktais nurodymais.
		PASTABA. Kuo druskų (SSC) koncentracija yra mažesnė, o formamido ir NP-40 koncentracija yra didesnė, tuo plovimas yra stipresnis.
Šviesūs arba neryškūs kontrastiniai dažai	Kontrastiniai dažai yra neryškūs; prieš dažant kontrastiniais dažais stikleliai su mėginiais nebuvo dehidratuoti arba kontrastiniuose dažuose buvo riebalų lašelių.	Nuimkite dengiamuosius stiklelius. 5 minutėms pamerkite stiklelius į aplinkos temperatūros 2X SSC / 0.1% NP-40; stiklelius dehidratuokite atlikdami 1 minutės trukmės skalavimo etanolio (70%, 85%, 100%) procedūras. Natūraliai išdžiovinkite ir pakartokite kontrastinį dažymą.

Problema	Galima priežastis	Galimas sprendimas
	Kontrastinių dažų koncentracija yra netinkama. PASTABA. DAPI I kontrastinių dažų koncentracija yra 8 kartus didesnė už DAPI II kontrastinių dažų koncentraciją.	Jeigu kontrastiniai dažai yra per šviesūs, prieš naudodami juos praskieskite blukimą slopinančiu tirpalu (katalogo Nr. 06J29-010). Kontrastinius dažus laikykite -20 °C (± 5°C), temperatūroje ir naudodami saugokite nuo šviesos. Įsitikinkite, kad kontrastiniai dažai nėra naudojami po galiojimo pabaigos datos.
	Kontrastiniai dažai yra per seni arba ilgą laiką buvo veikiami šviesos.	

Nuorodos

- Perkins AS, Friedberg JW, Burkitt lymphoma in adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;341-8.
- Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: non-Hodgkin's lymphomas. National Comprehensive Cancer Network. 2009;3:1-156. Prieinama: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/nhl.pdf. Skaityta 2009 m. lapkričio 16 d.
- Paternoster SF, Brockman SR, McClure RF, et al. A new method to extract nuclei from paraffin-embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol*. 2002;160(6):1967-72.
- Einerson RR, Law ME, Blair HE, et al. Novel FISH probes designed to detect IGH-MYC and IGL-MYC rearrangements in B-cell lineage malignancy identify a new breakpoint cluster region designated BVR2. *Leukemia*. 2006;20(10):1790-9.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.
- Wiktor 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). *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.
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Pastaba dėl skaičių rašybos:

- Tūkstančiams atskirti naudojamas kablelis arba tarpas (pavyzdžiui, 10,000 mėginių, 10 000 mėginių).
- Sveikojo skaičiaus daliai nuo dešimtainės forma parašytos trupmeninės skaičiaus dalies atskirti naudojamas taškas (pavyzdžiui, 3.12%).

Techninė pagalba

Prireikus techninės pagalbos, kreipkitės į „Abbott Molecular“ techninės pagalbos vietos skyrių arba apsilankykite „Abbott Molecular“ interneto svetainėje adresu <http://www.abbottmolecular.com>.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold ir ThermoBrite yra „Abbott“ įmonių grupės prekių ženklai įvairiose šalyse.

Visi kiti prekių ženklai yra atitinkamų savininkų nuosavybė.



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



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

© 2010, 2020 Abbott. Visos teisės saugomos.

www.abbottmolecular.com

2020 m. gegužės mėn.