



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPS 021-S / LPS 021

TMPRSS2/ERG Deletion/Breakapart Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKA

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

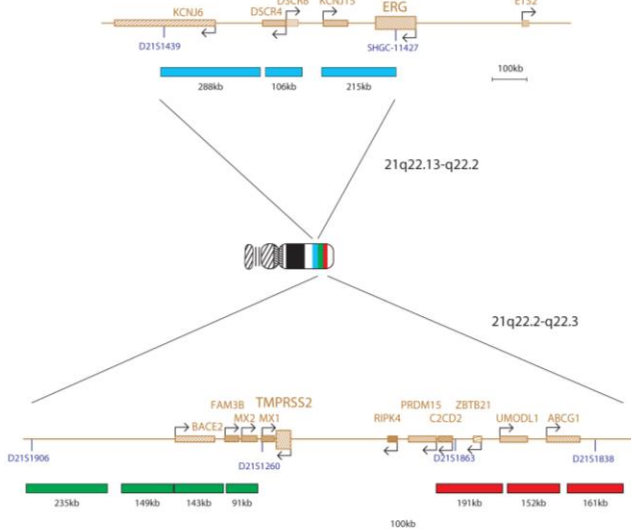
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują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

Informacje o sondzie

Najnowsze badania wskazują, że w ponad 50% guzów gruczolaka krokowego mogą być obecne rearanżacje chromosomu 21q22¹. Geny biorące udział w tych translokacjach to gen kodujący indukowaną androgenami transbłonową proteazę serynową TMPRSS2 (Transmembrane protease, serine 2 (21q22.3)) oraz gen kodujący czynnik transkrypcyjny z rodziny ETS (E-twenty six), ERG (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (21q22.2))¹. Wewnątrzchromosomalna delecja sekwencji o długości 3 Mz znajdującej się na chromosomie 21. powoduje fuzję genu TMPRSS2 z genem ERG. Rearanżacja ta sprawia, że gen ERG podlega pod regulowaną androgenami kontrolę transkrypcyjną genu TMPRSS2². Obecność tej fuzji jest związana z progresją choroby, natomiast obecność rearanżacji w raku gruczolaka krokowego może odpowiadać za heterogeniczność molekularną i kliniczną³. Stwierdzenie takich zmian molekularnych umożliwia wyodrębnienie podklas raka gruczolaka krokowego, co ma istotne znaczenie z biologicznego i klinicznego punktu widzenia³.

Specyfikacja sondy

TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, kolor czerwony
TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, kolor zielony
ERG, 21q22.13-q22.2, kolor niebieski



Produkt TMPRSS2/ERG Deletion/Breakapart Probe to mieszanina sond o trzech różnych kolorach, która zawiera sondy wyznakowane zielonym fluoroforem i sondy wyznakowane czerwonym fluoroforem komplementarne względem każdej strony genu TMPRSS2, a także trzy sondy wyznakowane niebieskim fluoroforem, które obejmują centromeryczny region genu ERG, aż do markera D21S1439.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy TMPRSS2 wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 84–105ng/test
Ilość sondy TMPRSS2 wyznakowanej zielonym fluoroforem: 300–375ng/test
Ilość sondy ERG wyznakowanej niebieskim fluoroforem: 358–448ng/test
Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC) i są gotowe do użycia.

Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów)

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

Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

Przechowywanie i postępowanie z produktem

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

Sprzęt wymagany, ale niedostarczany

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

Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rтעיowej i obiektywu planapochromatycznego przy powiększeniu x63 lub x100. Do jednoczesnej obserwacji wszystkich fluoroforów i barwnika DAPI optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy DAPI/FITC/Texas Red. Alternatywnie do obserwacji czerwonego i zielonego fluoroforu można użyć podwójnego filtra pasmowo-przepustowego FITC/Texas Red. Niebieski fluorofor wykazuje specyficzną względem widma Aqua i DEAC (wymagany jest pojedynczy filtr pasmowo-przepustowy Aqua lub DEAC).

Przygotowanie próbek

Zestaw zaprojektowano do użytku na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) skrawkach tkanek lub mikromacierzach tkankowych (TMA), które należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Do procedury FISH należy używać skrawków tkanek FFPE o grubości 4–6 µm.

Wstępna obróbka próbek tkanek

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

Protokół FISH

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

Denaturacja wstępna

1. Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
2. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
3. Pobrać 10–15 µl (odpowiednio do wielkości próbki tkanki) roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
4. Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.

5. Wkropić 10–15 µl mieszaniny sond na próbkę i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

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

Hybrydyzacja

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

Płukania po hybrydyzacji

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

Uwagi

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

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

Stabilność wykonanych preparatów

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

Zalecenia dotyczące procedury

1. Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę CytoCell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
2. Na potrzeby pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów zdecydowanie zalecane jest korzystanie ze skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
3. Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
4. Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.

Wyniki oczekiwane

W komórce prawidłowej oczekiwane są 2 sygnały stanowiące połączenie sygnału czerwonego, zielonego i niebieskiego (mogą być widoczne jako sygnały żółte — 2Ż). Delecja sekwencji docelowej, z którą komplementarna jest sonda, powoduje otrzymanie 1 sygnału stanowiącego połączenie sygnału czerwonego, zielonego i niebieskiego (może być widoczny jako sygnał żółty Ż) i 1 sygnału stanowiącego połączenie sygnału czerwonego i niebieskiego (1CZ, 1CN). Obecność translokacji z udziałem genu TMRSS2 spowoduje otrzymanie wzorca 1CZN, 1ZN, 1C: 1 sygnał czerwony i 1 sygnał stanowiący połączenie sygnału zielonego i niebieskiego dla chromosomu pochodnego oraz 1 fuzyjny sygnał stanowiący połączenie sygnału czerwonego, zielonego i niebieskiego dla chromosomu prawidłowego. Obecność translokacji z udziałem genu ERG spowoduje otrzymanie wzorca 1CZN, 1CZ, 1N: 1 sygnał niebieski i 1 sygnał stanowiący połączenie sygnału czerwonego i zielonego dla chromosomu pochodnego oraz 1 fuzyjny sygnał stanowiący połączenie sygnału czerwonego, zielonego i niebieskiego dla chromosomu prawidłowego.

Ograniczenia

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

Dodatkowe informacje

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









Tel.: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

1. Saramaki *et al.*, Clin Cancer Res 2008;14(11):3395-3400.
2. Lapointe *et al.*, Modern Pathology 2007;20(4):467-473.
3. Perner *et al.*, Cancer Res 2006;66(17):8337-8341.

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

Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Ltd. Ten produkt zawiera technologię na licencji firmy Life Technologies Corporation i jest dostępny do użytku wyłącznie na potrzeby diagnostyki człowieka lub badań z zakresu nauk przyrodniczych.

CytoCell Ltd.

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

