



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPS 018-S / LPS 018

FGFR1 Breakpart/Amplification Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

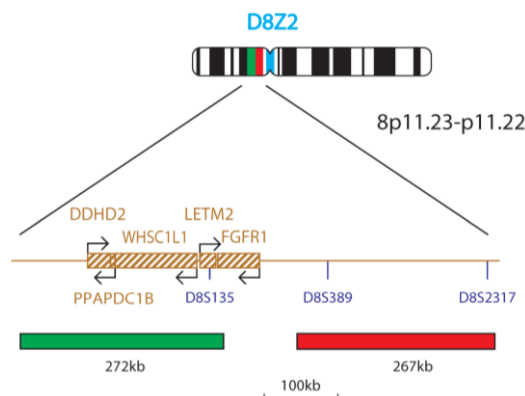
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują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

Gen kodujący receptor czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGFR1), zlokalizowany na chromosomie 8, był pierwszym genem, którego amplifikację wykazano w związku z niektórymi rodzajami raka sutka¹. Gen ten ulega również translokacji w przypadku niektórych pacjentów z zespołem mieloproliferacyjnym 8p11². Uważa się, że amplifikacja tego genu jest czynnikiem sprawczym w około 10% guzów sutka³; wykazano także, że jej wystąpienie wskazuje na złe rokowanie, ponieważ produkt nadekspresji genu może prowadzić do wczesnego nawrotu choroby⁴. Gen FGFR1, podobnie do innych defektów genetycznych występujących w zaburzeniach limfoproliferacyjnych, takich jak translokacja BCR/ABL w CML, również zawiera sekwencje, które przypuszczalnie mogłyby kodować powiązane z zespołem mieloproliferacyjnym (znanym również jako EMS lub białaczka/chłoniak z komórek macierzystych, SCLL) białko, kinazę tyrozynową^{5,6}, co podkreśla znaczenie tego genu zarówno w przypadku guzów litych, jak i raków krwi. Istnieje co najmniej osiem genów partnerskich uczestniczących w translokacjach FGFR1. Do genów tych należą: ZNF198 (występujący najczęściej), FOP, CEP110, BCR, HERV-K, FGFR10P2, TIF1 i MYO18A⁸. Firma CytoCell opracowała trójkolorową sondę FISH, za pomocą której można jednocześnie wykryć punkt złamania oraz amplifikację genu FGFR1. Sonda może być używana zarówno w próbkach szpiku kostnego pobranych od pacjentów z zespołem mieloproliferacyjnym (EMS), jak i skrawkach tkanek pobranych od pacjentów z podejrzeniem wystąpienia amplifikacji genu. W przypadku EMS strategia wykrywania punktu złamania polega na uwidocznieniu rozdzielienia jednego z dwóch sygnałów fuzyjnych razem z niebieskim centromerem, służącym do oznaczenia chromosomu 8. Natomiast u pacjentów badanych pod kątem amplifikacji genu FGFR1, sonda FISH genu FGFR1, który nie uległ translokacji, będzie występować w formie zamplifikowanego sygnału fuzyjnego. W takim przypadku sonda centromeru chromosomu 8 posłuży również jako sonda kontrolna.

Specyfikacja sondy

FGFR1, 8p11.23-p11.22, kolor czerwony
FGFR1, 8p11.23-p11.22, kolor zielony
D8Z2, 8p11.1-q11.1, kolor niebieski



Produkt FGFR1 Breakpart/Amplification Probe zawiera sondę o długości 272 kb wyznakaną zielonym fluoroforem i sondę o długości 267 kb wyznakaną czerwonym fluoroforem, komplementarne względem każdej strony genu FGFR1. Sonda centromeru chromosomu 8 wyznakaną niebieskim fluoroforem pełni funkcję kontroli dla chromosomu 8.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy FGFR1 wyznakaną czerwonym fluoroforem: 80–100 ng/test
Ilość sondy FGFR1 wyznakaną zielonym fluoroforem: 240–300 ng/test
Ilość sondy centromeru chromosomu 8 wyznakaną niebieskim fluoroforem: 84–105 ng/test
Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC) i są gotowe do użycia.

Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów)

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

Ostrzeżenia i środki ostrożności

1. Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
2. Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
3. Mieszany sond zawierają formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Nosić rękawiczki, 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 różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl.
3. Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72°C.
4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”).
6. 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 rtęciowej i obiektywu planapochromatycznego przy powiększeniu x63 lub x100. Do jednoczesnej obserwacji wszystkich fluoroforów i barwnika DAPI optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy DAPI/FITC/Texas Red. Alternatywnie do obserwacji czerwonego i zielonego fluoroforu można użyć podwójnego filtra pasmowo-przepustowego FITC/Texas Red. Niebieski fluorofor wykazuje specyficzność względem widma Aqua i DEAC (wymagany jest pojedynczy filtr pasmowo-przepustowy Aqua lub DEAC).

Przygotowanie próbek

Ten zestaw zaprojektowano do użytku z następującymi próbkami:

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

DS150/CE-pl v010.00/2020-12-01 (S009 v4)

Strona 1 z 3

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

Protokół FISH

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

Procedura dla próbek FFPE

Wstępna obróbka próbek tkanek

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

Denaturacja wstępna

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 próbki 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 antyfade na każdą próbkę.
12. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić zajście reakcji barwnej.
13. Obejrzyć pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Procedura dla krwi obwodowej lub komórek szpiku kostnego z hodowli

Przygotowanie szkiełek

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

Denaturacja wstępna

5. Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
6. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
7. Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do próbki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
8. Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
9. Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

10. Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

Hybrydyzacja

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

Płukania po hybrydyzacji

12. Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
13. Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
14. 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.
15. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10–15 µl barwnika DAPI antyfade na każdą próbkę.
16. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić zajście reakcji barwnej.
17. Obejrzyć pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Uwagi

Wydatność 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. Nie jest zalecane wypiekanie ani postarzanie preparatów zawierających próbki krwi obwodowej lub szpiku kostnego, ponieważ może to zmniejszyć fluorescencję sygnału.
2. Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd. może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
3. 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.
4. 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.
5. Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.

Wyniki oczekiwane

Firma CytoCell opracowała trójkolorową sondę FISH, za pomocą której można jednocześnie wykryć punkt złamania oraz amplifikację genu FGFR1. Sonda może być używana zarówno w próbkach szpiku kostnego pobranych od pacjentów z EMS, jak i skrawkach tkanek pobranych od pacjentów, u których istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia amplifikacji.

W przypadku EMS istotną rolę odgrywa domena kinazy tyrozynowej FGFR1, dlatego detekcja zaangażowanego genu partnerskiego pozostaje mniej ważna niż ustalenie występowania translokacji prowadzącej do zaburzenia działania genu FGFR1. W tym wypadku strategia wykrywania punktu złamania polega na uwidocznieniu konwencjonalnego rozdzielenia jednego z dwóch sygnałów fuzyjnych na sygnał czerwony i sygnał zielony oraz uwidocznieniu niebieskiego centromeru chromosomu 8, służącego do oznaczenia chromosomu 8. Ta dodatkowa sonda, mimo że w tym przypadku nie jest bezwzględnie istotna, może działać jako dodatkowy środek do numerowania chromosomów.

Strategia wykrywania punktu złamania nie jest istotna u pacjentów badanych pod kątem amplifikacji genu FGFR1. Sygnał FISH genu FGFR1, który nie uległ translokacji, będzie spowodowany przyłączeniem sondy fuzyjnej i będzie występować w formie zamplifikowanego sygnału fuzyjnego. W celu prawidłowego oznaczenia tej sondy w skrawkach tkanek przydatna jest sonda centromeru chromosomu 8, dająca sygnał w kontrastującym (niebieskim) kolorze.

W prawidłowej komórce z powodu bliskiego ustawienia sond obserwowane są 2 żółte sygnały fuzyjne i 2 niebieskie sygnały kontrolne (2Ż, 2N). W przypadku translokacji w 8p11 występuje jeden sygnał fuzyjny oraz dochodzi do rozdzielenia drugiego sygnału, co prowadzi do konformacji 1 żółtego, 1 czerwonego, 1 zielonego i 2 niebieskich sygnałów (1Ż, 1C, 1Z, 2N). W przypadku amplifikacji genu FGFR1 obserwowane są co najmniej 3 żółte sygnały fuzyjne i 2 niebieskie sygnały kontrolne (3+Ż, 2N).

Ograniczenia

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

Dodatkowe informacje

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






Tel.: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytozell.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

1. Theillet *et al.*, Genes Chromosomes Cancer 1993;7:219-26
2. Macdonald *et al.*, Leukemia 1995;9:1628-30
3. Courjal *F et al.*, Cancer Res 1997;57(19):4360-7
4. Turner *N et al.*, Cancer Res 2010;70(5):2085-94
5. Ruta *M et al.*, Oncogene 1988;3:9-15
6. Smedley *et al.*, Hum Mol Genet 1998;7(4):637-42
7. Xiao *et al.*, Nature Genet 1998;18:84-7
8. Huret *JL.* FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 2008

REF	PL: Numer katalogowy
IVD	PL: Wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>
LOT	PL: Kod partii
	PL: Zajrzyj do instrukcji używania
	PL: Wytwórca
	PL: Użyć do daty
	PL: Dopuszczalna temperatura
	PL: Zawartość wystarczająca do <n> testów
CONT	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, Wielka Brytania
Tel.: +44(0)1223 294048
Faks: +44(0)1223 294986
E-mail: probes@cytoCell.com
Strona WWW: www.ogt.com