



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPS 030-S / LPS 030

CCND1 Breakpart Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

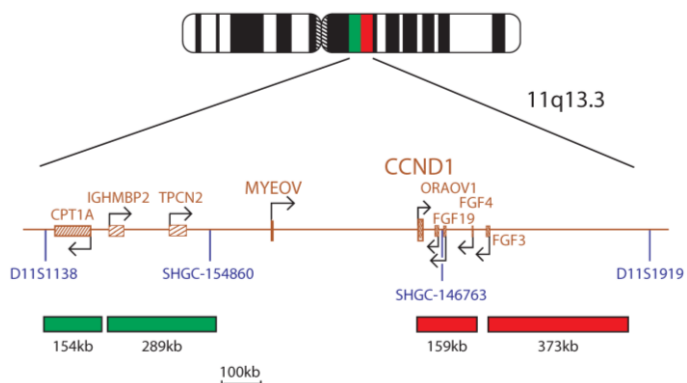
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują 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 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

Gen CCND1 (cyklina D1) zlokalizowany w regionie 11q13.3 koduje białko należące do wysoce konserwatywnej rodziny cyklin. Mutacje, amplifikacje i nadekspresja tego genu, wpływające na progresję cyklu komórkowego, są często obserwowane w różnych nowotworach i mogą przyczyniać się do ich powstawania¹. Cykliny pełnią funkcję regulatorów kinaz zależnych od cyklin (Cyclin Dependent Kinases, CDK). Białko kodowane przez gen CCND1 stanowi podjednostkę regulatorową na kompleksach z białkami CDK4 lub CDK8, których aktywność jest wymagana do przejścia z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego¹. Translokacja t(11;14)(q13;q32) zachodząca między genem CCND1 a genem kodującym łańcuch ciężki immunoglobulin (IGH) została opisana jako molekularna cecha charakterystyczna chłoniaka z komórek płaszczka (Mantle Cell Lymphoma, MCL)^{2,5}, podtypu chłoniaka nie-Hodgkina z komórek B, i prowadzi do nadekspresji cykliny D1. Szacuje się, że translokacja ta występuje w 53–93% przypadków MCL³. Obserwowano ją również u 10–25% chorych na szpiczaka mnogiego z nieprawidłowym wynikiem badań cytogenetycznych⁴.

Specyfikacja sondy

CCND1, 11q13.3, kolor czerwony
CCND1, 11q13.3, kolor zielony



Produkt CCND1 zawiera dwie sondy o długości 154 kb i 289 kb, oznakowane zielonym fluoroforem, położone centromerycznie względem genu CCND1, oraz dwie sondy oznakowane czerwonym fluoroforem, o długości 159 kb i 373 kb,

obejmujące gen CCND1 i przylegające do regionów położonych telomerycznie aż do markera D11S1919.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy CCND1 oznakowanej czerwonym fluoroforem: 120–150 ng/test
Ilość sondy CCND1 oznakowanej zielonym fluoroforem: 360–450 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. 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. 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 obiektów 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 obiektu 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.

Przygotowanie próbek

Ten zestaw zaprojektowano do użytku z następującymi próbkami:

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

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 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. Obejrzeć 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 przeniesić pobraną objętość do próbki mikrowirowkowej. 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 minut.

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 antifade na każdą próbkę.
16. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
17. Obejrzeć 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 białka, 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

W komórce prawidłowej oczekiwane są 2 sygnały stanowiące połączenie sygnału czerwonego i zielonego (mogą być widoczne jako sygnały żółte — ZŻ). Obecność translokacji spowoduje otrzymanie wzorca 1C, 1Z, 1Ż: 1 sygnał zielony i 1 sygnał czerwony dla chromosomów, w których doszło do translokacji, oraz 1 sygnał fuzyjny stanowiący połączenie sygnału czerwonego i zielonego (może być widoczny jako sygnał żółty) 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. RefSeq, Jul 2008
2. Vose JM, *et al.*, *Am J Hematol* 2012;87(6):604-9
3. Rahman K *et al.*, *Indian J Pathol* 2012;55:66-71
4. Hoyer JD *et al.*, *Am J Clin Pathol* 2000;113(6):831-7
5. Avet-Loiseau *et al.* *Genes Chromosomes Cancer*. 1998; 23(2):175-82.

	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

