Vysis LSI D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange Probe

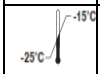
en

REF 01N37-020

30-608223/R4

Vysis LSI D13S25 (13q14.3)
SpectrumOrange Probe
REF 01N37-020
30-608223/R4

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурые ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления делеции исследуемой последовательности зонда LSI D13S25 на участке хромосомы 13q14.3.

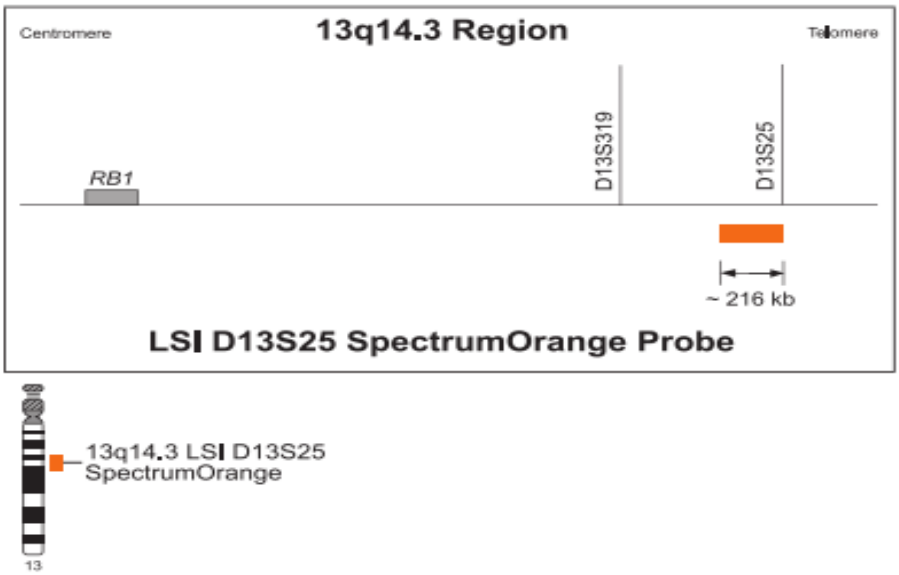
Описание процедуры и пояснения

Делеция 13q или отсутствие 13 хромосомы наблюдается при некоторых гемобластозах. После того, как стало известно, что делеция на участке 13q14 наблюдается при многих других заболеваниях, проведены исследования, направленные на установление механизмов, вовлеченных в патогенез (например, Corcoran и др.[1], Calin и др.[2], Mertens и др.[3]). Хотя внимание исследователей было направлено, главным образом, на изучение участка 13q14.3, содержащего D13S319, miR15, miR16 и DLEU2, другие участки тоже были делетированы. Помимо других локусов иногда исследуют локус D13S25, который расположен на 540 килобаз дистальнее D13S319.

В нескольких исследованиях LSI D13S25 использовался для выявления делеций на участке 13q14.3. Для обследования 600 пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом Navarro и др.[4] использовали FISH и с помощью зондов Vysis LSI RB1, LSI D13S319 и LSI D13S25 обнаружили делеции на участке 13q14. Konigsberg и др.[5] использовали три зонда Vysis FISH для изучения делеций на участке 13q14 хромосомы плазматических клеток костного мозга 29 пациентов с моноклональной гаммапатией неустановленной значимости.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание зонда
Размер зонда LSI D13S25 SpectrumOrange составляет 216 килобаз.



Реагенты
1. Зонд Vysis LSI D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange (серия № 30-190029)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 75 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения

Зонд Vysis LSI D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки
Во время транспортировки зонд Vysis LSI D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности
Предназначен только для диагностики *in vitro*.
Vysis LSI D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange Probe.

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.
Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)

● 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
● 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
● Стеклянные сосуды Коплина
● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипеттор (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[5], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ожидаемые результаты

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью зонда LSI D13S25 приведет к появлению двух оранжевых сигналов. В ядре, содержащем делецию на участке одного гомолога 13-ой хромосомы, для которого предназначен зонд LSI D13S25, будет наблюдаться один оранжевый сигнал. Если делеции присутствуют на обоих гомологах, то оранжевого сигнала не будет. При изучении других патологических образцов можно получить другие результаты. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[6], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в	Теплые (45-50ºC) микропрепараты

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºС в течение 3 недель.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

красителя.	краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Список использованной литературы

1. Corcoran MM, Hammarsund M, Zhu C, et al. DLEU2 Encodes an Antisense RNA for the Putative Bicistronic RFP2/LEU5 Gene in Humans and Mouse. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:285-97.
2. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15524-29.
3. Mertens D, Wolf S, Tschuch C, et al. Allelic silencing at the tumor-suppressor locus 13q14.3 suggests an epigenetic tumor-suppressor mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(20):7741-46.
4. Navarro B, Garcia-Marco JA, Jones D, et al. Association and clonal distribution of trisomy 12 and 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1998;102:1330-34.
5. Konigsberg R, Ackermann J, Kaufmann H, et al. Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2000;14:1975-79.
6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange Probe и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента 5, 491, 224 B1, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.). Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP и Vysis являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.). SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumOrange,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

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

CE

ABBOTT
Max Plank-Ring 2
65205 Wiesbaden Germany

© 2007, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Июнь 2020 г.
30-608223/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

en

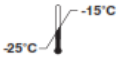
REF 08L57-020

30-608206/R5

Vysis LSI MLL Dual Color,
Break Apart Rearrangement Probe
REF 08L57-020
30-608206/R5

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Назначение

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения транслокаций, вовлекающих ген MLL. Данная проба может быть использована в отношении хромосом в метафазе или ядер в интерфазе.

Краткое описание тестирования

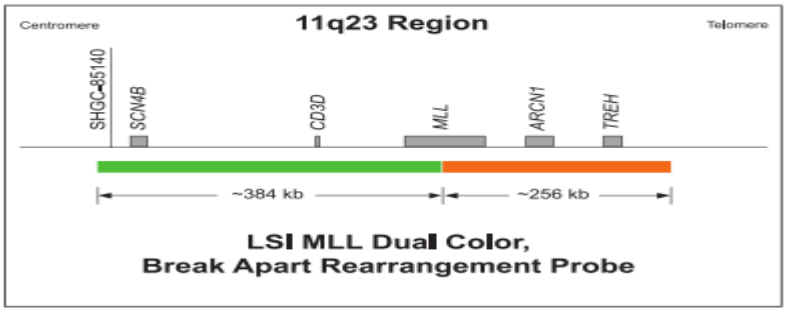
Транслокации, вовлекающие ген недифференцированного лейкоза MLL, локализованный в сегменте хромосомы 11q23, встречаются при остром лимфо- (ОЛЛ) и миелолейкозе (ОМЛ).

В целом, реарранжировки гена MLL ассоциированы с более плохим прогнозом.[1,2] Было идентифицировано около 30 генов транслокации MLL. Из двух предполагаемых генов слияния, один содержит 5 последовательностей MLL производных 11 хромосомы, а другой – 3 последовательности MLL аномальной хромосомы, обычно определяются лишь транскрипции гена слияния 5 MLL`. Области локализации инициации сайта реарранжировки располагаются в области экзонов MLL 5-11[3].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание пробы

5` центромерная проба MLL SpectrumGreen™ начинается между экзонами 6 и 8 примерно на 384 т.н. к центромере 11 хромосомы. 3` теломерная проба MLL SpectrumOrange™ начинается между экзонами 4 и 6 и продолжается примерно на 256 т.н. к теломере хромосомы 11q.

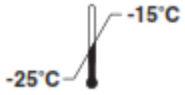


Реагенты

1. **Vysis LSI MLL двухцветная проба, Набор пробы реарранжировки распада (Серийный номер. 30-190083)** (1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 150 нг/мкл LSI MLL. Набор пробы реарранжировки распада

2. Vysis LSI/WCP® Буфер гибридизации (Серийный номер. 30-804826) (1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению



The Vysis LSI MLL Набор пробы реарранжировки распада и Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**

Vysis LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe.

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр со стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Промывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H_2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C (±5) или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа
Клетки костного мозга и периферической крови должны быть культивированы, фиксированы, и помещены на микроскопические препараты в процессе стандартных цитогенетических процедур.

Методика

Требуемые материалы
- Vysis LSI MLL Набор пробы реарранжировки распада
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Требуемые, но не предоставляемые материалы
- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Сушка препаратов

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP® и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погружайте не более, чем 4 препарата одновременно.

3. Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

Приготовление пробной смеси

1. Добавьте следующие ингредиенты для каждой целевой области, в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C .

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов. Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Методика быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло одного препарата и немедленно погрузите препарат в 0.4X SSC/0.3% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Повторите эту манипуляцию с каждым препаратом.
2. Удалите препараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температуре отмывочного раствора составляет 73±1°C до помывки других препаратов.

3. Погрузите препараты в 2X SSC/0.1% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Удалите препараты через 5 секунд - 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите препараты на воздухе в темноте.
2. Добавьте 10 мкл красителя DAPI II к целевой области препарата и накройте покровным стеклом.

Осмотрите препараты с использованием подходящего набора фильтров для флуоресцентной микроскопии. Следующие наборы фильтров будут визуализированы флуорофорами, использованными в гибридизации.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: Препараты, которые хранятся при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте могут быть проанализированы в течение, по крайней мере, 3 недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения препаратов образцов с пробами и покровными стеклами, на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, препараты удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
2 мкл очищенной H_2O

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H_2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite™. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite™ может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа-или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл красителя в целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена с использованием соответствующих контролей и аналитических методик [6] наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования.

Ожидаемые результаты

Каждая нормальная копия целевой области MLL наблюдается как слияние оранжевого/зеленого или желтого цвета, что образует нормальный рисунок сигнала двух слияний. Транслокации MLL и других хромосомных реарранжировок, которые разбивают пробную область MLL, обычно дают рисунок сигнала одного оранжевого цвета, одного зеленого цвета и одного слияния. Могут также наблюдаться другие аномальные рисунки сигналов.

При использовании пробы FISH, аномальные ядра дают 1 сигнал зеленого цвета, 1 зеленого, и одно слияние.[4] Дополнительные данные для некоторых из данных случаев соответствуют конкурентной транслокации и делеции последовательностей 3' области локализации сайта реарранжировки, как это было описано другими.[5] Напротив, другие случаи с тем же рисунком сигнала не содержали реарранжировки MLL.[4] Относительно рисунков потери сигнала 3' MLL оранжевого цвета, авторы данного исследования предполагают наличие дополнительных техник для использования с целью уточнения статуса MLL.

В AML, данная проба определяет увеличенные копии гена MLL в результате различных механизмов, в то время, как распад гена MLL обусловленная вставкой.[6]

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена путем утилизации соответствующих контролей и аналитических техник[7] наряду с учетов других клинических и диагностических данных тестирования.

Устранение неисправностей в отношении результатов количественного определения коденатурации

Морфология хромосомы, наблюдаемая во время гибридизации с применением коденатурации, может отличаться от образца, который был денатурирован и дегидрирован до применения пробы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C.
Тусклая проба	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Увеличьте время гибридизации • Повысьте температуру плавления. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как морфология станет приемлемой. • Отмойте слайд с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 70-73°C.
Диффузный сигнал	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Отмойте с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 73-76°C.
Плохая морфология метафазы	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Снизьте температуру плавления на 2°C. • Снизьте время плавления • ПРИМЕЧАНИЕ: При необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Предварительно обработайте препараты: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите препарат в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3.Погрузите препарат несколько раз в очищенную воду. 4. Дегидрируйте препараты путем нескольких моек в EtOH длительностью 1 минута (70%, 85%, 100%). 5. Высушите препараты на воздухе и продолжайте приготовления препарата для коденатурации. • Если морфология продолжает оставаться плохой, модифицируйте использование инструмента HYBrite: 1. Приготовьте 280 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации (196 нл формамида/28 нл 2X SSC/56 нл очищенной H2O). 2. Включите программу холодной температуры HYBrite при 73°C. 3. Поместите 10 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации в каждую целевую область и накройте покровным стеклом. 4. При достижении HYBrite 73°C, поместите препараты на нагревательную поверхность. Закройте крышку. 5. Удалите препараты через 3 минуты. 6. Удалите покровные стекла. 7. Продолжите шаги по дегидрации в процессе приготовления целевого образца по методике количественно определения коденатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение неполадок

При анализе результатов количественного определения FISH, убедитесь, что ваш микроскоп правильно настроен и оптимально функционирует. В следующей таблице приведены некоторые результаты, которые вы можете получить в процессе выполнения проб LSI. Возможные причины и предложения по улучшению качества процесса приведены ниже.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Искажение морфологии хромосом	Препараты высохли слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани для сушки препаратов. Понизьте температуру сушки во время приготовления. Увеличьте время сушки до ночи при комнатной температуре, затем выдержите, по крайней мере, 24 часа при комнатной температуре. Не сушите препараты при высокой температуре.
	Образец пере-денатурирован.	Убедитесь, что раствор для денатурации был произведен согласно инструкции. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C до погружения препарата, снизьте температуру до 72°C. Уменьшите время погружения препарата в раствор на 1-3 минуты.
	Образца препаратов не до конца высохли перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образцы препаратов до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты сериями моек EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%, 100%).
	Препараты образцов слишком свежие для денатурации.	Выдержите слайды, по крайней мере, в течение 24 часов при комнатной температуре.
Высокий фон препарата	Стекла не достаточно очищены до приготовления препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите досуха с использованием нетканой бумаги.
	Клеточный детрит.	Отмойте клеточный детрит свежим фиксатором трижды и повторите процедуру.
	Выдерживание метафаз слишком длительное или содержит цитоплазму.	Увеличьте время погружения раствора денатурации до 10 минут.
	Препарат недостаточно отмыт в процессе гибридизации.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что pH и температура отмывочных растворов правильные. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру мойки.
Высокий фон препарата	Отмывочные растворы используются слишком долго или хранятся неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы, содержащие формамид, должны храниться при температуре при 4°C. Утилизировать через 7 дней частого использования. Утилизировать все остальные отмывочные растворы через 1 день. Убедитесь, что pH формамида составляет 7 0.8 0
	Видимая гибридизация с использованием длинных полосных фильтров.	Переключитесь на фильтры с меньшей шириной полос или мультиполосных фильтров для ограничения фонового света.
Слабый сигнал или отсутствие сигнала	Препарат образца неадекватно денатурирован.	Убедитесь, что температура раствора для денатурации в сосуде Коплина составляет 73±1°C до погружения препарата. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74°C. Увеличьте время погружения препарата

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		в раствор для денатурации на 2-4 минуты.
	Препарат образца не достаточно подготовлен для FISH.	Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для протоколов, описывающих способ приготовления образца для FISH.
	Препараты образца неправильно выдержаны после использования.	Выдержите 24 часа при комнатной температуре до проведения FISH.
	Препараты образца не достаточно сухие перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образец до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты через серии моек в EtOH (70%, 85%, 100%).
	Образец был недостаточно смешан	Использование трипсин – Гимзе полосных образцов для FISH может потребовать регулирования полосности или протоколов гибридизации. Для дальнейшей информации по полосности перед FISH, свяжитесь с технической службой Abbott Molecular. Или приготовьте свежие препараты.
	Проба не добавлена	Приготовьте новую пробную смесь. Дайте пробе отмокнуть. Перемешайте реагенты, центрифугируйте. Медленно отмерьте пипеткой.
	Проба, буфер для гибридизации, и пробная смесь не были хорошо смешаны перед использованием.	Перемешайте или отмерьте пипеткой реагенты перед смешиванием, центрифугируйте.
	Пробы неправильно разведены для гибридизации.	Используйте объемы, заявленные в методике для поддержания соотношения пробной смеси (7 нл буфера для гибридизации: 1 нл пробы: 2 нл очищенной H2O). Убедитесь, что пипетка калибрована. Оставьте буфер для гибридизации на некоторое время и дайте ему достигнуть комнатной температуры перед использованием, медленно отмерьте пипеткой.
	Проба неправильно денатурирована. ПРИМЕЧАНИЕ: Не относится к пробам, поставляемым в буфере для гибридизации или денатурированном виде.	Убедитесь, что температура водяной бани использованной для денатурации пробной смеси составляет 73±1°C Денатурируйте пробную смесь в течение 5 минут.
	Проба не использована в отношении целевого образца сразу же после денатурации.	Спланируйте так, что пробы немедленно будет использована после того, как препараты извлечены из раствора 100% EtOH solution. Убедитесь, что EtOH испарился. Удалите пробирку, содержащую пробную смесь из 73±1°C водяной бани и немедленно поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C. Держите пробирку на нагревателе препаратов во время того, как отмериваете пипеткой пробу на препарат. Обработайте максимальное количество препаратов и поддерживайте правильные температуры и время обработки согласно методике.
Слабый сигнал или его отсутстви	Пробная смесь слишком сухая на препарате образца.	Немедленно поместите покровное стекло на целевую область после обработки пробной смеси. При помывке, удалите покровное стекло с 1 препарата и немедленно погрузите

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

е		препарат в отмывочный раствор до удаления покровного стекла со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло путем касания поверхности пробной смеси. Поместите препарат с покровным стеклом в блоттер и мягко выдавите пузырьки воздуха.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что заявленное время и температура гибридизации были соблюдены. Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C. Закрепите покровное стекло резиновым цементом, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Условия помывки или отмывочные растворы приготовлены неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что температуры отмывочных растворов для методики соблюдены. Убедитесь, что термометры и pH метры откалиброваны правильно. Удалите покровные стекла до погружения препаратов в отмывочный раствор.
	Пробы или препараты образцов неправильно хранятся.	Храните неразведенную пробу при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Храните негибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в течение продолжительного времени или при комнатной температуре в течение короткого периода времени. Храните гибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте с течение 3 недель.
	Использован неправильный краситель. Краситель слишком яркий.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты путем погружений в EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%,100%). Высушите препараты на воздухе и снова обработайте красителем.
	Видимая гибридизация с использованием несоответствующего набора фильтров.	Наборы мультиполосных фильтров обеспечивают меньше света, чем одиночные наборы фильтров, поэтому пробные сигналы могут побледнеть при просмотре с помощью мультиполосных наборов фильтров. Используйте правильный фильтр для просмотра флуорофоров пробы. Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для получения дальнейшей информации.
	Не соответствующая результатам FISH конфигурация микроскопа, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Пробы разведены не соответствующим образом, часто слишком много пробы для количественного определения.	Убедитесь, что пробная смесь была сделана согласно инструкции.
	Несоответствующие условия	Убедитесь, что температура инкубатора

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	гибридизации.	составляет 37°C.
	Температура помывки слишком низкая.	Убедитесь, что буфер для гибридизации был добавлен к пробной смеси в соответствующем количестве. Поддерживайте температуру отмывочных растворов путем помещения 4 сосудов в сосуд Коплина и убедитесь, что температура отмывочного раствора правильная до мойки препаратов.
	Точность приготовления отмывочного раствора очень низкая.	Убедитесь, что отмывочные растворы были сделаны согласно инструкции. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем точнее приготовление.
Яркое или слабое окрашивание	Слабое окрашивание: препараты не достаточно дегидрированы до окрашивания или в красителе присутствуют капли масла. Неправильная концентрация красителя.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты серией 1-минутных моек в EtOH (70%, 85%,100%). Высушите на воздухе и снова добавьте краситель.
	ПРИМЕЧАНИЕ: краситель DAPI I в 8 раз более концентрированный, чем DAPI II.	Если окрашивание слишком яркое, разведите краситель в растворе (Список номер. 06J29-010) до использования.
	Краситель слишком старый или хранился на свету в течение продолжительного периода времени.	Храните краситель при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Библиография

1. Pui C, Gaynon PS, Boyett JM, et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002; 359:1909-15.
2. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, et al. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003;102:2395-2402.
3. Li Z-Y, Liu D-P, Liang C-C. New insight into the molecular mechanisims of MLL-associated leukemia. *Leukemia* 2005;19:183-190.
4. Barber KE, Ford AM, Harris RL, et al. *MLL* translocations with concurrent 3' deletions: interpretation of FISH results. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;41:266-71.
5. Corral J, Forster A, Thompson S, et al. Acute leukemias of different lineages have similar *MLL* gene fusions encoding related chimeric proteins resulting from chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:8538-42.
6. Arnaud B, Douet-Guilbert N, Morel F, et al. Screening by fluorescence in situ hybridization for *MLL* status at diagnosis in 239 unselected patients with acute myeloblastic leukemia. *Cancer Genetics Cytogenetics* 2005;161:110-15.
7. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med* 2006;8:16-23.
8. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Par 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
11. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт компании http://www.abbottmolecular.com.
Vysis LSI MLL Dual Color Break Apart Rearrangement Probe Set и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).
ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2006, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020 г.
30-608206/R5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

en

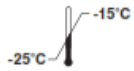
REF 08L63-020

30-608216/R3

Vysis LSI IGH Dual Color,
Break Apart Rearrangement Probe
REF 08L63-020
30-608216/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Назначение

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения разрывов локуса IGH (тяжелых цепей иммуноглобулинов) которые ассоциированы с хромосомными аномалиями, такими, как транслокации.

Краткое описание тестирования

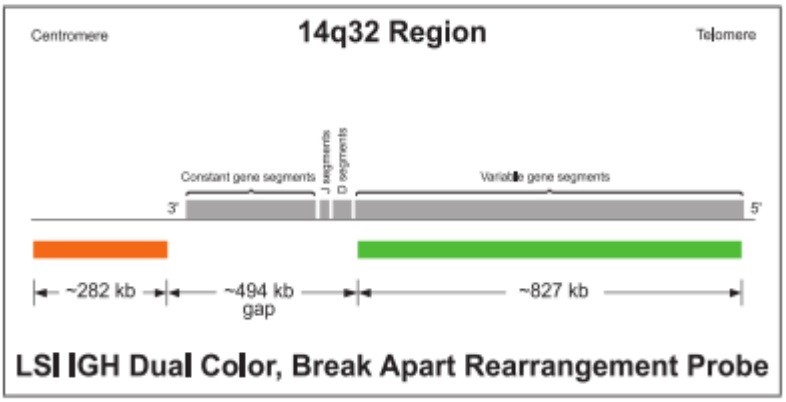
Транслокации с разрывами в пределах локуса IGH часто встречаются при В-клеточных ЗНО и вовлекают большое количество партнеров транслокации.[1] Двухцветная проба разрывов реаранжировки Vysis LSI IGH охватывает две различно окрашенные (оранжевого и зеленого цвета) пробы, целью которых являются противоположные стороны распространенных разрывов IGH. В нормальных ядрах в интерфазе, данная конфигурация вызывает либо двухцветное слияние, либо два сигнала разного цвета в каждом интактном локусе IGH. При хромосомных разрывах между двумя пробными целями, 2 сигнала, ассоциированные с разорванной аллелью IGH могут разделиться. Хотя проба IGH BAP может быть использована для определения разрывов в пределах IGH, ассоциированных с любым партнером слияния, она не может определить генного партнера, вовлеченного в хромосомную перестройку. Проба Vysis IGH BAP была использована в большом количестве исследований для установления вовлечения IGH в хромосомные перестройки.[2-5]

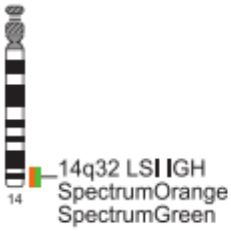
Описание пробы

Приблизительно 827 kb пробы SpectrumGreen LSI IGHV (IGH-вариабельная) охватывает практически весь регион IGH. Цель гибридизации 282 kb SpectrumOrange LSI IGH 3′ пробы лежит

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

в другом 3′ (центромерном) по отношению к IGH локусе. Существует промежуток между двумя сегментами пробы, примерно в 494 kb.





Реагенты

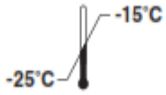
1. Двухцветная проба разрывов реаранжировки Vysis LSI IGH (Серийный номер. 30-191019)

(1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 600 нг/мкл. Флуорофор-маркированная проба ДНК и блокирующая ДНК в трис-ЭДТА буфере.

2. Vysis LSI/WCP буфер гибридизации (Серийный номер. 30-804826)

(1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению



Двухцветная проба разрывов реаранжировки Vysis LSI IGH и Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки Двухцветная проба разрывов перестройки Vysis LSI IGH транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Только для диагностического использования *In Vitro*.**

Vysis LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа
Вонгхауорт (Wongchaowart) и другие [6], описал применение пробы IGH BAP на залитых в парафин срезах тканей, пораженных лимфомой. Несколько лабораторий сообщили, что они использовали пробу IGH BAP на стандартных клеточных препаратах.[4-5] Ремштайн (Remstein) и другие [7] провели скрининг большого числа клеток лимфомы MALT-типа путем гибридизации пробы IGH BAP с ядрами, выделенными из образцов ткани, залитых в парафиновые блоки, по методу Патерностера и др. соавторов [8].

Методика
Требуемые материалы

- Двухцветная проба разрывов реаранжировки Vysis LSI IGH
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Столик для нагрева стекол с препаратами

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.

- Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
- Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более 4 стекол в сосуды Коплина одновременно.

- Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH**.** ПРИМЕЧАНИЕ**:** Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подержите препараты в 100% этаноле, пока все препараты полностью н высохнут и нанесите пробу.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
   7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
   1 мкл зонда
   2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.**

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: **Если препараты готовы, когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.**

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов.

Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Процедура быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.**

Подготовьте отмывочные растворы:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1– секунды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температура промывочных растворов 73±1ºC, прежде, чем промывать другие 4 слайда.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через интервал от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

- Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
- На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения микроскопических стекол с образцами, пробами и покровными стеклами на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, их удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
1 мкл очищенной H2O

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (± 1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа - или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл конткрасителя на целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена с использованием соответствующих контролей и аналитических методик [9] наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования.

Ожидаемые результаты

В нормальном ядре, гибридизированном с использованием пробы IGH BAP, ожидаемый рисунок сигналов образуется 2 оранжевыми/зелеными слияниями, которые могут быть видимыми как оранжевые/зеленые сигналы, немного разделенные из-за промежутка в покрытии целевой области. В ядре с транслокацией в локусе IGH, наиболее распространенный рисунок содержит 1 оранжевый, 1 зеленый, и оранжевый/зеленый (желтый) сигнал слияния (с возможным промежутком). При некоторых аномалиях, уменьшение (или отсутствие) зеленого сигнала в пределах слияния не является не распространенным, из-за делеции в пределах сегментов IGHV в зеленой целевой области в результате нормальной соматической рекомбинации V-D-J.

Также, дополнительные рисунки могут наблюдаться в некоторых аномальных образцах.

Устранение проблем коденатурации

Морфология хромосомы, наблюдаемая во время гибридизации с применением коденатурации, может отличаться от образца, который был денатурирован и дегидрирован до применения пробы.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите количественное определение на новом образце используя один из следующих шагов: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C.
Тусклая проба	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Увеличьте время гибридизации • Повысьте температуру плавления. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как морфология станет приемлемой. • Отмойте слайд с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 70-73°C.
Диффузный сигнал (точечный)	Повторите количественное определение на новом образце используя один из следующих шагов: • Снизьте температуру на 2°C. • Снизьте температуру плавления на 2°C. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Отмойте с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 73-76°C.
Плохая морфология метафазы	Повторите количественное определение на новом образце используя один из следующих шагов: • Снизьте температуру плавления на 2°C. • Снизьте время плавления • **ПРИМЕЧАНИЕ:** При необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Предварительно обработайте препараты: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите препарат в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3.Погрузите препарат несколько раз в очищенную воду. 4. Дегидрируйте препараты путем нескольких моек в EtOH длительностью 1 минута (70%, 85%, 100%). 5. Высушите препараты на воздухе и продолжайте приготовления препарата для коденатурации. • Если морфология продолжает оставаться плохой, модифицируйте использование инструмента HYBrite: 1. Приготовьте 280 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл очищенной H2O). 2. Включите программу холодной температуры HYBrite при 73°C. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации в каждую целевую область и накройте покровным стеклом. 4. При достижении HYBrite 73°C, поместите препараты на нагревательную поверхность. Закройте крышку. 5. Удалите препараты через 3 минуты. 6. Удалите покровные стекла. 7. Продолжите шаги по дегидрации в процессе приготовления целевого образца по методике количественно определения коденатурации.

Устранение проблем и рекомендации

При анализе результатов количественного определения FISH, убедитесь, что ваш микроскоп правильно настроен и оптимально функционирует. В следующей таблице приведены некоторые результаты, которые вы можете получить в процессе выполнения проб LSI. Возможные причины и предложения по улучшению качества процесса приведены ниже.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Искажение морфологи и хромосом	Микропрепараты высохли слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани для сушки микропрепаратов. Понизьте температуру сушки во время приготовления. Увеличьте время сушки до ночи при комнатной температуре, затем выдержите по крайней мере 24 часа при комнатной температуре. Не сушите микропрепараты при высокой температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Избыточная денатурация образца	Убедитесь, что раствор для денатурации был произведен согласно инструкции. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C до погружения препарата, снизьте температуру до 72°C. Уменьшите время погружения препарата в раствор на 1-3 минуты.
	Микроскопические стекла с образцами (препараты) не до конца высохли перед погружением в денатурирующий раствор	Разогрейте микроскопические стекла с образцами до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты сериями моек EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%, 100%).
	Микроскопические стекла с образцами слишком свежие для денатурации.	Выдержите микроскопические стекла с образцами, по крайней мере, в течение 24 часов при комнатной температуре.
Высокий фон препарата	Стекла не достаточно очищены до приготовления препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите досуха с использованием нетканой бумаги.
	Продукты распада клеток.	Отмойте клеточный детрит свежим фиксатором трижды и повторите процедуру.
	Выдерживание метафаз слишком длительное или содержит цитоплазму.	Увеличьте время погружения раствора денатурации до 10 минут.
	Препарат недостаточно отмыт после гибридизации.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что pH и температура отмывочных раствором правильные. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру мойки.
Высокий фон препарата	Отмывочные растворы используются слишком долго или хранятся неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы, содержащие формамид, должны храниться при температуре при 4°C. Утилизировать через 7 дней частого использования. Утилизировать все остальные отмывочные растворы через 1 день. Убедитесь, что pH формамида составляет 7,0-8,0
	Видимая гибридизация с использованием длинных полосных фильтров.	Переключитесь на фильтры с меньшей шириной полос или мультиполосных фильтров для ограничения фонового света.
Слабый сигнал или отсутствие сигнала	Образец неправильно денатурирован.	Убедитесь, что температура раствора для денатурации в сосуде Коплина составляет 73±1°C до погружения препарата. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74°C. Увеличьте время погружения препарата в раствор для денатурации на 2-4 минуты.
	Препарат образца не достаточно подготовлен для FISH.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для протоколов, описывающих способ приготовления образца для FISH.
	Препараты образца неправильно выдержаны после использования.	Выдержите 24 часа при комнатной температуре до проведения FISH.
	Препараты образца не достаточно сухие перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образец до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты через серии моек в EtOH (70%, 85%, 100%).
	GTG-бэндинг образца	Использование образцов, обработанных трипсином и окрашенных красителем Гимзе (trypsin-Giemsa), для FISH может потребовать регулировки бэндинга или протоколов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		гибридизации. Для дальнейшей информации по бэндингу перед проведением FISH, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте свежие препараты.
	Проба не добавлена	Приготовьте новую смесь проб. Полностью разморозьте. Встряхните на вортексе, недолго центрифугируйте . Медленно капните реагенты пипеткой в смесь.
	Проба, буфер для гибридизации и смесь проб не были хорошо смешаны перед использованием.	Перемешайте на вортексе или добавьте пипеткой реагенты перед смешиванием, немного центрифугируйте.
	Пробы неправильно разведены для гибридизации.	Используйте объемы заявленные в методике для поддержания соотношения пробной смеси (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл пробы: 2 мкл очищенной H_2O). Убедитесь, что пипетка калибрована. Оставьте буфер для гибридизации на некоторое время и дайте ему достигнуть комнатной температуры перед использованием, медленно отмерьте пипеткой.
	Проба неправильно денатурирована. ПРИМЕЧАНИЕ: Не относится к пробам, поставляемым в буфере для гибридизации или денатурированном виде.	Убедитесь, что температура водяной бани использованной для денатурации пробной смеси составляет 73±1°C Денатурируйте пробную смесь в течение 5 минут.
	Проба не использована в отношении целевого образца сразу же после денатурации.	Необходимо наносить пробы сразу же после извлечения микроскопических стекол из раствора 100% EtOH. Убедитесь, что EtOH испарился. Удалите пробирку, содержащую пробную смесь из 73±1°C водяной бани и немедленно поместите пробирку на нагреватель при температуре 45-50°C. Держите пробирку на нагревателе во время пипетирования пробы на микроскопическое стекло. Обработайте максимально возможное количество микроскопических стекол и поддерживайте правильные температуры и время обработки согласно процедуре.
Слабый сигнал или его отсутствие	Пробная смесь слишком сухая на препарате образца.	Немедленно поместите покровное стекло на целевую область после обработки пробной смеси. При помывке, удалите покровное стекло с 1 препарата и немедленно погрузите препарат в отмывочный раствор до удаления покровного стекла со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Опустите покровное стекло с первого касания смеси проб. Поместите препарат с покровным стеклом в блоттер и мягко выдавите пузырьки воздуха.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что заявленное время и температура гибридизации были соблюдены. Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C. Закрепите покровное стекло резиновым клеем, не оставляя промежутков.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Увеличьте время гибридизации.
	Условия помывки или отмывочные растворы приготовлены неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что температуры отмывочных растворов для методики соблюдены. Убедитесь, что термометры и pH метры откалиброваны правильно. Удалите покровные стекла до погружения препаратов в отмывочный раствор.
	Пробы или микроскопические стекла с образцами неправильно хранятся.	Храните неразведенную пробу при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Храните негибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в течение продолжительного времени или при комнатной температуре в течение короткого периода времени. Храните гибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте с течение 3 недель.
	Использован неправильный краситель. Краситель слишком яркий.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты путем погружений в EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%,100%). Высушите препараты на воздухе и снова обработайте красителем.
	Видимая гибридизация с использованием несоответствующего набора фильтров.	Наборы мультиполосных фильтров обеспечивают меньше света, чем одиночные наборы фильтров, поэтому пробные сигналы могут побледнеть при просмотре с помощью мультиполосных наборов фильтров. Используйте правильный фильтр для просмотра флуорофоров пробы. Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для получения дальнейшей информации.
	Конфигурация микроскопа или исследуемые объекты не подходят для изучения FISH результатов, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Пробы разведены не соответствующим образом, часто слишком много пробы для количественного определения.	Убедитесь, что пробная смесь была сделана согласно инструкции.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C.
	Температура промывки слишком низкая.	Убедитесь, что буфер для гибридизации был добавлен к пробной смеси в соответствующем количестве. Поддерживайте температуру отмывочных растворов путем помещения не более 4 предметных стекол в сосуд Коплина и убедитесь, что температура отмывочного раствора правильная до мойки препаратов.
	Точность приготовления отмывочного раствора очень низкая.	Убедитесь, что отмывочные растворы были сделаны согласно инструкции. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		(SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем точнее приготовление.
Яркое или слабое окрашивание	Слабое окрашивание: препараты не достаточно дегидрированы до окрашивания или в красителе присутствуют капли масла. Неправильная концентрация красителя. ПРИМЕЧАНИЕ: краситель DAPI I в 8 раз более концентрированный, чем DAPI II. Краситель слишком старый или хранился на свету в течение продолжительного периода времени.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты серией 1-минутных моек в EtOH (70%, 85%,100%). Высушите на воздухе и снова добавьте краситель. Если окрашивание слишком яркое, разведите краситель в растворе (Список номер. 06J29-010) до использования. Храните краситель при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Библиография

1. Willis TG and Dyer MJS. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. Blood 2000;96(3):808-822.
2. Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, et al. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. Blood 2003;101(6):2335-39.
3. Boersma-Vreugdenhil GR, Kuipers J, Van Stralen E, et al. The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MAFB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint. Br J Haematol 2004;126:355-363.
4. Liu S, Lijin B, Liu X, et al. IGH gene involvement in two cases of acute lymphoblastic leukemia with t(14;14)(q11;q32) identified by sequential R-banding and fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 2004;152:141-45.
5. Wlodarska I, Veyt E, De Paepe P, et al. FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. Leukemia 2005;19:1299-1305.
6. Wongchaowart NT, Kim B, Hsi ED, et. t(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is uncommon in cutaneous MALT lymphomas and primary cutaneous diffuse large B-cell lymphomas. J Cutan Pathol 2006;33:286-92.
7. Remstein ED, Dogan A, Einerson RR, et al. The incidence and anatomic site specificity of chromosomal translocations in primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) in North America. AM J Surg Pathol 2006;30:1546-53.
8. 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.
9. 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.
10. Wlodarska I, Matthews C, Veyt E, et al. Telomeric IGH Losses Detectable by Fluorescence in Situ Hybridization in Chronic Lymphocytic Leukemia Reflect Somatic VH Recombination Events. JMD 2007;9(1):47-54
11 US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
13. 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.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva:World Health Organization, 2004.

Техническая помощь:

За получением дополнительной информации обращайтесь в Техническую Службу компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт компании http://www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI IGH Dual Color Break Apart Rearrangement Probe Set и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента 5, 663, 319 и 5, 491, 224, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.
Методы, основанные на одновременного детектирования сигналов гибридизации защищены американскими патентами 6, 203, 977, лицензированными исключительно компанией Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) Йельским университетом.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).
ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2006, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020 г.
30-608216/R3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI 21 SpectrumOrange Probe

en

REF 08L54-020

30-608201/R5

Vysis LSI 21
SpectrumOrange Probe
REF 08L54-020
30-608201/R5

Изменения выделены

Обозначения

GTIN	Глобальный торговый идентификационный номер
	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Международная Служба поддержки клиентов
Позвоните представителю Abbott в своей стране

Перед использованием внимательно прочтите листок-вкладыш. Следует соблюдать рекомендации, указанные в инструкции внутри упаковки. Достоверность результатов не может быть гарантирована если были произведены какие-либо отклонения от рекомендаций, указанных в инструкции внутри упаковки.

Название

Vysis LSI 21 SpectrumOrange Probe

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления увеличения количества хромосом 21 или копий исследуемой последовательности зонда LSI 21.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание процедуры и пояснения

Образцы клеток, добавленные на слайды к микроскопу с использованием стандартных цитогенетических методик, используются для этой процедуры. В результате этого метода двухцепочечная ДНК денатурирует до одноцепочечной, что впоследствии позволяет гибридизироваться с зондом LSI 21 SpectrumOrange Probe. После гибридизации несвязанный зонд удаляется путем серии промывок и ядра прокрашиваются конткрасителем DAPI, вследствие чего ДНК флуоресцирует синим цветом. Гибридизация зонда Vysis LSI 21 SpectrumOrange рассматривается с использованием флуоресцентного микроскопа, оснащенного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссии, позволяющего визуализировать оранжевый флуоресцентный сигнал и окрашенные синим ядра.

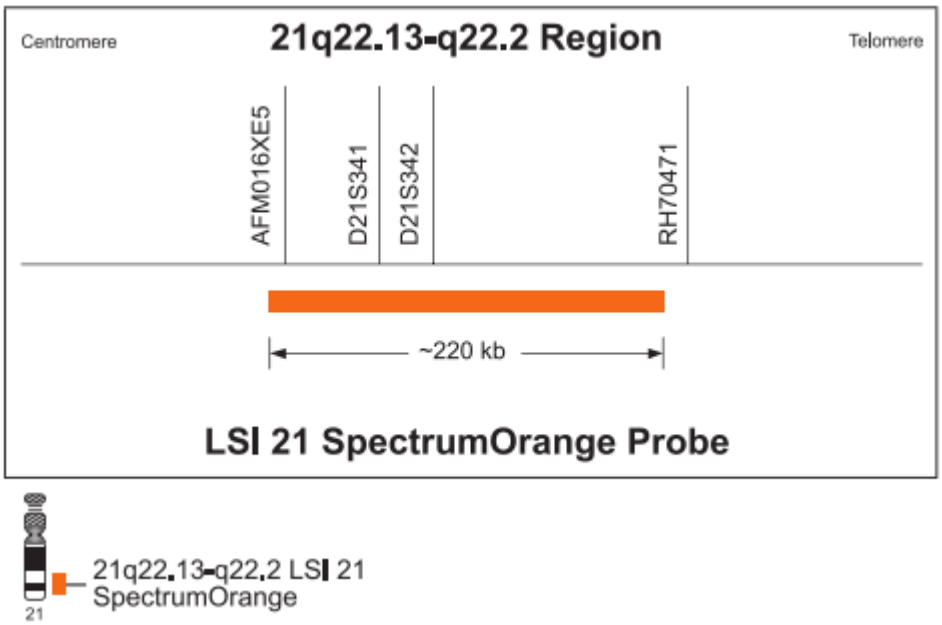
В клетках с обычным числом Vysis LSI 21 SpectrumOrange пробы ожидается два оранжевых сигнала. В клетках с атипичным числом Vysis LSI 21 SpectrumOrange пробы ожидается один оранжевый или три оранжевых сигнала. Интерпретация результатов FISH должна производиться с использованием соответствующих средств контроля и аналитических методов, а также принимая во внимание другие данные клинических и диагностических исследований.

Принцип метода FISH

Метод FISH-это уникальная технология, которая позволяет визуализировать специфические сиквенсовые последовательности нуклеиновых кислот в клеточном препарате. В частности, FISH-включает точный отжиг одноцепочечного, меченого флуорохромом ДНК-зонда, комплементарного таргетной последовательности. Гибридизация пробы с клеточной ДНК детектируется с использованием флуоресцентной микроскопии. Интерпретация результатов FISH должна производиться с использованием соответствующих средств контроля и аналитических методов, а также принимая во внимание другие данные клинических и диагностических исследований.

Описание зонда

SpectrumOrange локусспецифическая идентификация (LSI) 21 составляет около 220 килобаз в длину (chr21:394399949-39659711; февраль 2009 Ассамблея UCSC Браузер генома человека)[2]. Зонд локализуется в локусе 21q22.13-q22.2. Vysis LSI 21 SpectrumOrange Probe локализуется на цитогенетическом участке 21q22.13-q22.2. И содержит D21S259, D21S341 и D21S342 маркеры.



Реагенты

1. Зонд Vysis LSI 21 SpectrumOrange (серия № 30-190002)

(1 флакон, 20 мкл/флакон). 100 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804826)**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения

Зонд Vysis LSI 21 SpectrumOrange и гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD

Предназначен только для диагностики *in vitro*.

Vysis LSI 21 SpectrumOrange Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI 21 SpectrumOrange Probe
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
● 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
● Стеклянные сосуды Коплина
● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипеттор (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100 % этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70 % раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.

1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.

3. Обработайте микропрепараты 70 % раствором этанола (1 мин.), затем 85 % раствором этанола (1 мин.) и 100 % этанолом (1 мин.).

ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100 % этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ± 1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45 – 50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100 % этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6 – 16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12 – 16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3 % NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ± 1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3 % NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.
1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1 – 3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73 ± 1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1 – 3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация
Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации
Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (± 1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.
Недостатки процедуры

- Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[1].
- Отдельные лаборатории должны установить аналитический верхний предел для интересующего атипичного сигнала.
- Набор не предназначен для оценки риска возникновения трисомии по 21 хромосоме.
- Результаты по зонду Vysis LSI 21 SpectrumOrange были установлены с использованием процедур, приведенных в листке-вкладыше.
- Изменения этих процедур могут повлиять на производительность анализа
- Интерпретация любых результатов теста должна оцениваться в рамках контекста других результатов лабораторных исследований.
- Результаты FISH-анализа могут быть неинформативными, если качество образца и/или подготовка предметных стекол выполнена неадекватно.

Ожидаемые результаты
Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью зонда LSI 21 приведет к появлению двух (2R) оранжевых сигналов. В ядре, содержащем более двух копий хромосомы 21 или большее количество определяемых последовательностей может наблюдаться увеличение количества сигналов, например один оранжевый (1R) или три (3R) оранжевых сигнала.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. **Подготовка слайдов для коденатурации** • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Библиография

1.Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluoresence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med* 2006;8(1):16-23.

2. Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz. The UCSC Genome Browser. The Regents of the University of California. Available at: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=185806115&clade=mammal&org=Human&db=hg18. Accessed [August 28, 2014].

3. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV].

4. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*

5. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

6. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI 21 SpectrumOrange Probe и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента 5, 491, 224, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue

Des Plaines, IL 60018 USA

ABBOTT
Max Plank-Ring 2
65205 Wiesbaden Germany

© 2006, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020 г.
30-608201/R5

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI 13 (13q14) SpectrumGreen Probe

en

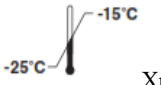
REF 08L67-020

30-608217/R4

Vysis LSI 13 (13q14)
SpectrumGreen Probe
REF 08L67-020
30-608217/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C)
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Назначение

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения изменений (прибавок/потерь) в количестве копии целевой последовательности пробы LSI 13 хромосомы 13q14.

Краткое описание тестирования

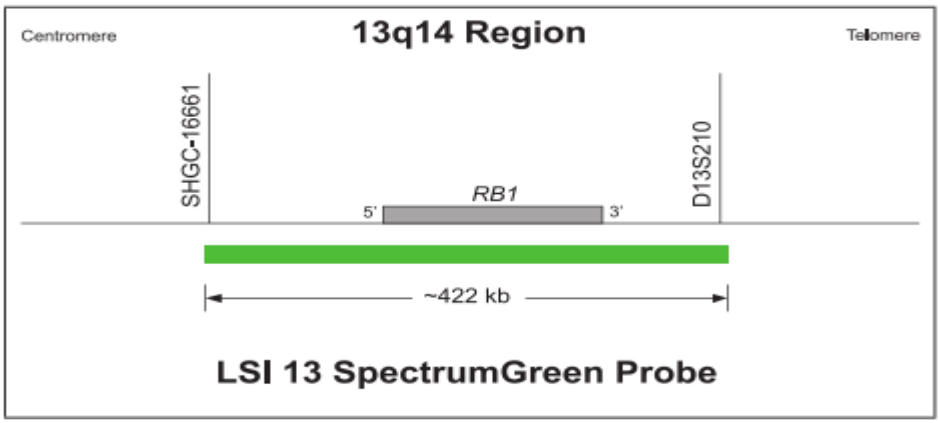
Проба LSI 13 SpectrumGreen является компонентом пренатального тестирования AneuVysion®. В пределах AneuVysion, данная проба была использована для скрининга прибавки хромосомы 13 (трисомии 13) в большом количестве образцов, и опубликованные результаты данных исследований показывают определение методом FISH трисомии 13 наряду с классическим цитогенетическим исследованием.[1]

Проба LSI 13 SpectrumGreen, которая содержит ген RB1, также используется для определения делеций 13q14 или моносомии 13 хромосомы. Fonseca и коллеги[2] используя LSI 13 и другие пробы 13q14 хромосомы, описали, что в 39 из 40 случаев множественной миеломы наблюдались делеции 13q14 LSI 13 и более дистальные маркеры D13S319 и D13S25 13q14. Лишь в 1 из 40 случаев наблюдалось выпадение D13S319 и D13S25 при сохранении обеих копий цели пробы LSI 13. Исследование дало повод полагать, что выпадение 13q при миеломе часто является обширным, и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

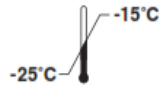
иногда присутствует моносомия 13. Также при множественной миеломе, Elnenaei и коллеги[3] сообщили о распространённой области делеции в 350 т.н. в 13q14.3, что включало маркер D13S319, но исключало фланги локусов RB1 и D13S25. В данном исследовании, все 29 случаев делеций 13q14 методом FISH, включали выпадение цели пробы LSI D13S319 в то время, как в 24 имели место делеции RB1 и в 22 выпадение D13S25.
Минимальные области делеции 13q14 были описаны при ХЛЛ, что включает близко расположенные маркеры D13S319 и D13S2724,5 и исключают более проксимальный ген RB1.

Описание пробы
Размером примерно 422 килобаз пробы SpectrumGreen LSI 13 содержит целый ген RB1 и локализовано в 13q14.



Реагенты
1. **Проба Vysis LSI 13 SpectrumGreen (Серийный номер 30-192018)**
(1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 200 нг/мкл. Флуорофор-маркированная пробы ДНК и блокирующий ДНК в трис-ЭДТА буфер.
2. **Vysis LSI/WCP® Буфер гибридизации (Серийный номер 30-804826)**
(1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению



Проба Vysis LSI 13 SpectrumGreen должна храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Меры предосторожности
IVD **Только для диагностического использования *In Vitro*.**
Vysis LSI 13 SpectrumOrange Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O, чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H_2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки

Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте. **Распадаемость:** Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа

Клетки костного мозга и периферической крови должны быть культивированы, фиксированы, и помещены на микроскопические препараты в процессе стандартных цитогенетических процедур.

Методика

Требуемые материалы

- Проба Vysis LSI 13 SpectrumGreen
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1 - 10 мкл
- Микродозатор объемом 1 - 10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Сушка препаратов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP® и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.
1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погружайте не более, чем 4 препарата одновременно.
3. Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

Приготовление пробной смеси
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.
2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.
1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов. Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Методика быстрой помывки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1 – 3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73 ± 1ºC.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1 – 3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флюорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения препаратов образцов с пробами и покровными стеклами, на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, препараты удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
2 мкл очищенной H_2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H_2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite™. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite™ может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл красителя в целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена с использованием соответствующих контролей и аналитических методик [6] наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования.

Ожидаемые результаты

Гибридизация нормальных клеток LSI 13 дает результат в виде 2 сигналов зеленого цвета. Аномальные клетки с выпадением одной из копий LSI 13 дают 1 зеленый сигнал. Аномальные клетки с прибавками цели пробы LSI 13 дают более, чем 2 зеленых сигнала.

Устранение неисправностей в отношении результатов количественного определения коденатурации

Морфология хромосомы, наблюдаемая во время гибридизации с применением коденатурации, может отличаться от образца, который был денатурирован и дегидрирован до применения пробы.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите количественное определение на новом образце, используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C.
Тусклая проба	Повторите количественное определение на новом образце, используя следующее:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Увеличьте время гибридизации • Повысьте температуру плавления. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как морфология станет приемлемой. • Отмойте слайд с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 70-73°C.
Диффузный сигнал	Повторите количественное определение на новом образце, используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Отмойте с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 73-76°C.
Плохая морфология метафазы	Повторите количественное определение на новом образце, используя следующее: • Снизьте температуру плавления на 2°C. • Снизьте время плавления • ПРИМЕЧАНИЕ: При необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Предварительно обработайте препараты: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите препарат в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3.Погрузите препарат несколько раз в очищенную воду. 4. Дегидрируйте препараты путем нескольких моек в EtOH длительностью 1 минута (70%, 85%, 100%). 5. Высушите препараты на воздухе и продолжайте приготовления препарата для коденатурации. • Если морфология продолжает оставаться плохой, модифицируйте использование инструмента HYBrite: 1. Приготовьте 280 нл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации (196 нл формамида/28 нл 2X SSC/56 нл очищенной H2O). 2. Включите программу холодной температуры HYBrite при 73°C. 3. Поместите 10 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации в каждую целевую область и накройте покровным стеклом. 4. При достижении HYBrite 73°C, поместите препараты на нагревательную поверхность. Закройте крышку. 5. Удалите препараты через 3 минуты. 6. Удалите покровные стекла. 7. Продолжите шаги по дегидрации в процессе приготовления целевого образца по методике количественно определения коденатурации.

Устранение неполадок

При анализе результатов количественного определения FISH, убедитесь, что ваш микроскоп правильно настроен и оптимально функционирует. В следующей таблице приведены некоторые результаты, которые вы можете получить в процессе выполнения проб LSI. Возможные причины и предложения по улучшению качества процесса приведены ниже.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Искажение морфологии хромосом	Препараты высохли слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани для сушки препаратов. Понизьте температуру сушки во время приготовления. Увеличьте время сушки до ночи при комнатной температуре, затем выдержите, по крайней мере, 24 часа при комнатной температуре. Не сушите препараты при высокой температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Образец пере-денатурирован.	Убедитесь, что раствор для денатурации был произведен согласно инструкции. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C до погружения препарата, снизьте температуру до 72°C. Уменьшите время погружения препарата в раствор на 1-3 минуты.
	Образца препаратов не до конца высохли перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образцы препаратов до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты сериями моек EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%, 100%).
	Препараты образцов слишком свежие для денатурации.	Выдержите слайды, по крайней мере, в течение 24 часов при комнатной температуре.
Высокий фон препарата	Стекла не достаточно очищены до приготовления препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите досуха с использованием нетканой бумаги.
	Клеточный детрит.	Отмойте клеточный детрит свежим фиксатором трижды и повторите процедуру.
	Выдерживание метафаз слишком длительное или содержит цитоплазму.	Увеличьте время погружения раствора денатурации до 10 минут.
	Препарат недостаточно отмыт в процессе гибридизации.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что pH и температура отмывочных растворов правильные. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру мойки.
Высокий фон препарата	Отмывочные растворы используются слишком долго или хранятся неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы, содержащие формамид, должны храниться при температуре при 4°C. Утилизировать через 7 дней частого использования. Утилизировать все остальные отмывочные растворы через 1 день. Убедитесь, что pH формамида составляет 7 0.8 0
	Видимая гибридизация с использованием длинных полосных фильтров.	Переключитесь на фильтры с меньшей шириной полос или мультиполосных фильтров для ограничения фонового света.
Слабый сигнал или отсутствие сигнала	Препарат образца неадекватно денатурирован.	Убедитесь, что температура раствора для денатурации в сосуде Коплина составляет 73±1°C до погружения препарата. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74°C. Увеличьте время погружения препарата в раствор для денатурации на 2-4 минуты.
	Препарат образца не достаточно подготовлен для FISH.	Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для протоколов, описывающих способ приготовления образца для FISH.
	Препараты образца неправильно выдержаны после использования.	Выдержите 24 часа при комнатной температуре до проведения FISH.
	Препараты образца не достаточно сухие перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образец до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты через серии моек в EtOH (70%, 85%, 100%).
	Образец был недостаточно смешан	Использование трипсин – Гимзе полосных образцов для FISH может потребовать регулирования полосности или протоколов гибридизации. Для дальнейшей информации по полосности перед FISH, свяжитесь с технической службой Abbott Molecular. Или приготовьте свежие препараты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Проба не добавлена	Приготовьте новую пробную смесь. Дайте пробе отмокнуть. Перемешайте реагенты, центрифугируйте. Медленно отмерьте пипеткой.
	Проба, буфер для гибридизации, и пробная смесь не были хорошо смешаны перед использованием.	Перемешайте или отмерьте пипеткой реагенты перед смешиванием, центрифугируйте.
	Пробы неправильно разведены для гибридизации.	Используйте объемы, заявленные в методике для поддержания соотношения пробной смеси (7 нл буфера для гибридизации: 1 нл пробы: 2 нл очищенной H2O). Убедитесь, что пипетка калибрована. Оставьте буфер для гибридизации на некоторое время и дайте ему достигнуть комнатной температуры перед использованием, медленно отмерьте пипеткой.
	Проба неправильно денатурирована. ПРИМЕЧАНИЕ: Не относится к пробам, поставляемым в буфере для гибридизации или денатурированном виде.	Убедитесь, что температура водяной бани кспользованной для денатурации пробной смеси составляет 73±1°C Денатурируйте пробную смесь в течение 5 минут.
	Проба не использована в отношении целевого образца сразу же после денатурации.	Спланируйте так, что пробы немедленно будет использована после того, как препараты извлечены из раствора 100% EtOH solution. Убедитесь, что EtOH испарился. Удалите пробирку, содержащую пробную смесь из 73±1°C водяной бани и немедленно поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C. Держите пробирку на нагревателе препаратов во время того, как отмериваете пипеткой пробу на препарат. Обработайте максимальное количество препаратов и поддерживайте правильные температуры и время обработки согласно методике.
Слабый сигнал или его отсутствие	Пробная смесь слишком сухая на препарате образца.	Немедленно поместите покровное стекло на целевую область после обработки пробной смеси. При помывке, удалите покровное стекло с 1 препарата и немедленно погрузите препарат в отмывочный раствор до удаления покровного стекла со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло путем касания поверхности пробной смеси. Поместите препарат с покровным стеклом в блоттер и мягко выдавите пузырьки воздуха.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что заявленное время и температура гибридизации были соблюдены. Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C. Закрепите покровное стекло резиновым цементом, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Условия помывки или отмывочные растворы приготовлены неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что температуры отмывочных растворов для методики соблюдены. Убедитесь, что термометры и pH метры

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		откалиброваны правильно. Удалите покровные стекла до погружения препаратов в отмывочный раствор.
	Пробы или препараты образцов неправильно хранятся.	Храните неразведенную пробу при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Храните негибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в течение продолжительного времени или при комнатной температуре в течение короткого периода времени. Храните гибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте с течение 3 недель.
	Использован неправильный краситель. Краситель слишком яркий.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты путем погружений в EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%,100%). Высушите препараты на воздухе и снова обработайте красителем.
	Видимая гибридизация с использованием несоответствующего набора фильтров.	Наборы мультиполосных фильтров обеспечивают меньше света, чем одиночные наборы фильтров, поэтому пробные сигналы могут побледнеть при просмотре с помощью мультиполосных наборов фильтров. Используйте правильный фильтр для просмотра флуорофоров пробы. Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для получения дальнейшей информации.
	Не соответствующая результатам FISH конфигурация микроскопа, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Пробы разведены не соответствующим образом, часто слишком много пробы для количественного определения.	Убедитесь, что пробная смесь была сделана согласно инструкции.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C.
	Температура помывки слишком низкая.	Убедитесь, что буфер для гибридизации был добавлен к пробной смеси в соответствующем количестве. Поддерживайте температуру отмывочных растворов путем помещения 4 сосудов в сосуд Коплина и убедитесь, что температура отмывочного раствора правильная до мойки препаратов.
	Точность приготовления отмывочного раствора очень низкая.	Убедитесь, что отмывочные растворы были сделаны согласно инструкции. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем точнее приготовление.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Яркое или слабое окрашивание	Слабое окрашивание: препараты не достаточно дегидрированы для окрашивания или в красителе присутствуют капли масла. Неправильная концентрация красителя. ПРИМЕЧАНИЕ: краситель DAPI I в 8 раз более концентрированный, чем DAPI II. Краситель слишком старый или хранился на свету в течение продолжительного периода времени.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты серией 1-минутных моек в EtOH (70%, 85%,100%). Высушите на воздухе и снова добавьте краситель. Если окрашивание слишком яркое, разведите краситель в растворе (Список номер. 06J29-010) до использования. Храните краситель при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Библиография

1. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. Prenat Diagn 2001;21:293-301.
2. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. Leukemia 2001;15:981-86.
3. Elnenaei MO, Hamoudi RA, Swansbury J, et al. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. Genes Chromosomes Cancer 2003;36:99-106.
4. Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. Genomics 1997;42:369-77.
5. Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J, et al. Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. Oncogene 1998;16:1891-97.
6. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genet Med 2006;8:16-23.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI 13 (13q14) SpectrumGreen Probe и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента 5, 491, 224, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).
Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.
CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).
ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

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

EC REP
ABBOTT GmbH &Co. KG
Max Plank-Ring 2
65205 Wiesbaden Germany

© 2006, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020 г.
30-608217/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI TP53 (17p13.1) SpectrumOrange Probe

en

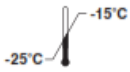
REF 08L64-020

30-608211/R4

Vysis LSI TP53 (17p13.1)
SpectrumOrange Probe
REF 08L64-020
30-608211/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Назначение

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения делеции LSI TP53 (p53), локализованного на хромосоме 17p13.1

Назначение теста

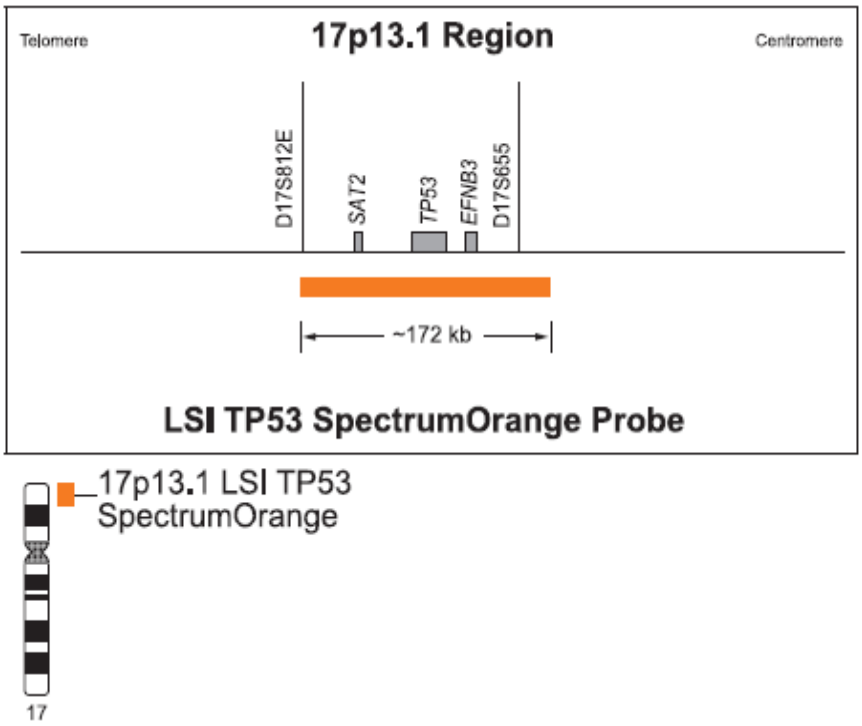
Ген p53 наиболее часто мутированный ген в различных опухолях человека. Наиболее широко отмечена делеция гена p53 в различных опухолях. Многочисленные исследования определили клиническую значимость потери функции гена p53 с помощью FISH исследования при хроническом лимфоцетарном лейкозе[1-4] и множественной миеломе[5-7].

Потеря региона гена p53 при хроническом лимфоцетарном лейкозе часто может отражать отсутствие короткого плеча 17 хромосомы, вызванного несбалансированной транслокацией или изохромосомным преобразованием[8].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание пробы

Проба LSI TP53 SpectrumOrange размером приблизительно 172 kb содержит полностью ген p53 и локализована на хромосоме 17p13.1.



Реагенты

1. Vysis LSI TP53 SpectrumOrange (17p13.1) Probe (номер серии № 30-190008)
(1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 100 нг/мкл Флуорофор-маркированная проба ДНК и ДНК блокированная в трис-ЭДТА)
2. **Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации (Серийный номер 30-804826)**
(1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению

Vysis LSI TP53 SpectrumOrange (17p13.1) SpectrumOrange Probe должна храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Меры предосторожности

IVD Предназначен только для диагностики in vitro
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange (17p13.1) проба.

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
Паспорта безопасности:
Важная информация о безопасной обработке, транспортировке и утилизации данного продукта содержится в Паспорте Безопасности.
Примечание:
Материалы Паспортов безопасности (MSDS) для всех реагентов, полученных в наборах, доступны по запросу в молекулярном отделе технического обслуживания Abbott.

Подготовка реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор

Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).
Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света.
Разрушение: под действием света флюорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флюорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.
Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI TP53 SpectrumOrange (17p13.1) проба
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипетка (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид ультравысокой очистки
- Контрастирующий краситель DAPI II
- Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100 % этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70 % раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.

1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.

3. Обработайте микропрепараты 70 % раствором этанола (1 мин.), затем 85 % раствором этанола (1 мин.) и 100 % этанолом (1 мин.).

ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100 % этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
   - 7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
   - 1 мкл зонда
   - 2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.**

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ± 1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45 – 50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.

ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100 % этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6 – 16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12 – 16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3 % NP-40.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ± 1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3 % NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1 – 3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73 ± 1ºC.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флюорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепарата с образцами, зондами и покровными стеклами помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.**

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (± 1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Для каждой лаборатории должны быть разработаны критерии проверки изменений при проведении теста.

Если при анализе наблюдаются нарушения, следует тщательно пересмотреть полученный результат, используя фильтр.

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[5], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ожидаемые результаты

Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью зонда LSI TP53 SpectrumOrange приведет к появлению двух оранжевых сигналов. Абнормальные ядра, возникающие в результате потери одной копии LSI TP53 гена будут иметь один оранжевый сигнал.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование «спекл-структур»)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1 – 3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73 ± 1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2 – 4 минут.
Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.

Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера : 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73 ± 1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Dohner H, Fischer K, Bentz M, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995;85(6):1580-89.
2. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2000;343:1910-16.
3. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53mutations and deletions. *Blood* 2004;103(9)3278-81.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, et al. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimunnotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol* 2006;24:437-43.
5. Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92(3):802-09.
6. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003;101(11):4569-75.
7. Chang H, Qi C, Yi QL, et al. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood* 2005;105(1):358-360.
8. Fink SR, Smoley SA, Stockero KJ, et al. Loss of TP53 is due to rearrangements involving chromosome region 17p10-p12 in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;167:177-81.
9. 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.
10. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
11. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
13. World Health Organization. *Laboratory Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт компании http://www.abbottmolecular.com.

Использование Vysis LSI TP53 SpectrumOrange (17p13.1) Probe или других проб Vysis осуществляется на основании американского патента 5, 491, 224, назначенного Abbott Molecular. Использование Vysis LSI проб прямого мечения осуществляется на основании американских патентов RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696 и 6,607,877 приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite, CEP, LSI, WCP являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

CE

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

EC REP

Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2006, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608211/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI RB1 (13q14) SpectrumOrange Probe

en

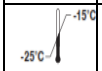
REF 08L65-020

30-608212/R3

Vysis LSI RB1 (13q14)
SpectrumOrange Probe
REF 08L65-020
30-608212/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурые ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения делеции целевой последовательности LSI RB1 содержащей ген RB1 хромосомы 13q14.

Краткое описание тестирования

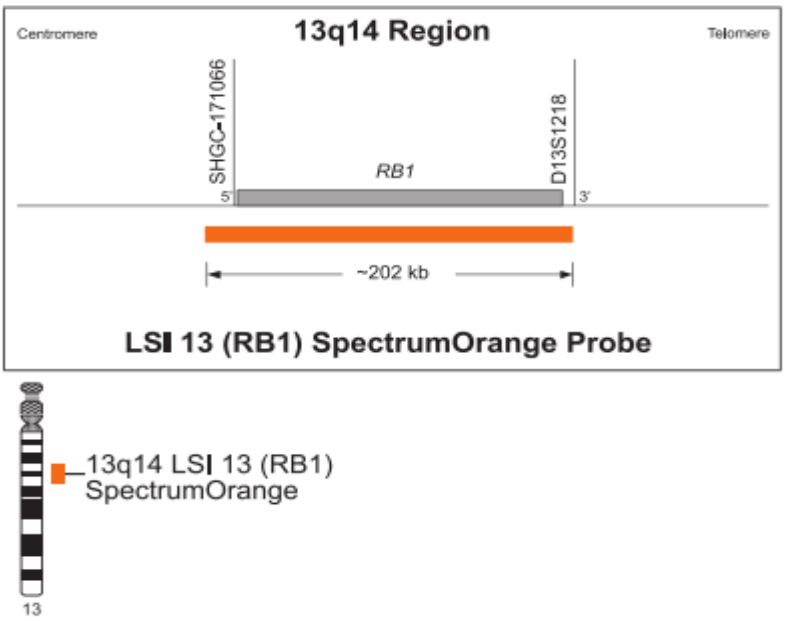
Ретинобластома обусловлена инактивацией обеих копий супрессорного гена RB1 локализованного в сегменте хромосомы 13q14. Существует несколько различных механизмов, которые могут инактивировать аллель RB1, одним из них является делеция гена RB1. В одном исследовании ретинобластомы, Amare и коллеги[1] использовали пробу SpectrumOrange LSI RB1 FISH и обнаружили в некоторых случаях делеции RB1. При множественной миеломе, Elnenaei и коллеги[2] сообщили о распространенной области делеции в 350 т.н. на 13q14.3 что включало маркер D13S319, но исключало локусы RB1 и D13S25. В данном исследовании, во всех 29 случаях делеции 13q14 методом FISH, наблюдались потери LSI D13S319, в то время, как в 24 случаях наблюдались делеции RB1 а в 22 утрата D13S25. Fonseca et al[3] сообщил о потере 13q при миеломе и в некоторых случаях – моносомии 13. Они обнаружили, что в 39 из 40 случаев множественной миеломы, были обнаружены выпадение 13q14, делеция RB1 и более дистальных маркеров D13S319 и D13S25 13q14. Лишь в 1 из 40 случаев наблюдались выпадение D13S319 и D13S25 при сохранении обоих копий RB1.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Минимальные области делеции 13q14 были описаны при хроническом лимфолейкозе, что включало близко расположенные маркеры D13S319 и D13S2724[4,5] и исключало более проксимальный ген RB1.

Описание пробы

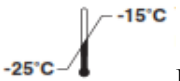
Примерно 220 т.н. пробы SpectrumOrange LSI RB1 содержит целый ген RB1 и локализовано в 13q14.



Реагенты

1. **Проба Vysis LSI RB1 (13q14) SpectrumOrange (Серийный номер 30-190001)**
(1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 100 нг/мкл. Флуорофор-маркированная проба ДНК и блокирующий ДНК в трис-ЭДТА буфере.
2. **Vysis LSI/WCP® Буфер гибридизации (Серийный номер 30-804826)**
(1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению



Проба Vysis LSI RB1 (13q14) SpectrumOrange и должна храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**

Vysis LSI RB1 (13q14) SpectrumOrange Probe.

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор

Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор

Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)

Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)

Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H_2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки

Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте. **Распадаемость:** Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа

Клетки костного мозга и периферической крови должны быть культивированы, фиксированы, и помещены на микроскопические препараты в процессе стандартных цитогенетических процедур.

Методика

Требуемые материалы

- **Проба Vysis LSI RB1 (13q14) SpectrumOrange**
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1 - 10 мкл
- Микродозатор объемом 1 - 10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Сушка препаратов

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP® и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: **Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.**

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **Погружайте не более, чем 4 препарата одновременно.**

3. Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.**

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: **Если препараты готовы когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.**

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов. Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Методика быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1 – 3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73 ±1°C.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флюорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения препаратов образцов с пробами и покровными стеклами, на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, препараты удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 мкл очищенной H_2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite™. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite™ может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл красителя в целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена с использованием соответствующих контролей и аналитических методик [6] наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования.

Ожидаемые результаты

Гибридизация LSI RB1 нормальных клеток приводит к образованию 2 оранжевых сигналов. Аномальные клетки с выпадением 1 копии LSI RB1 дают 1 оранжевый сигнал. Аномальные клетки с LSI RB1 дают больше 2 оранжевых сигналов.

Устранение неисправностей в отношении результатов количественного определения коденатурации

Морфология хромосомы, наблюдаемая во время гибридизации с применением коденатурации, может отличаться от образца, который был денатурирован и дегидрирован до применения пробы.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C.
Тусклая проба	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее: • Увеличьте время гибридизации • Повысьте температуру плавления. При необходимости, продолжайте

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	повышать температуру до того, как морфология станет приемлемой. • Отмойте слайд с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 70-73°C.
Диффузный сигнал	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Отмойте с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 73-76°C.
Плохая морфология метафазы	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее: • Снизьте температуру плавления на 2°C. • Снизьте время плавления • ПРИМЕЧАНИЕ: При необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Предварительно обработайте препараты: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите препарат в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3.Погрузите препарат несколько раз в очищенную воду. 4. Дегидрируйте препараты путем нескольких моек в EtOH длительностью 1 минута (70%, 85%, 100%). 5. Высушите препараты на воздухе и продолжайте приготовления препарата для коденатурации. • Если морфология продолжает оставаться плохой, модифицируйте использование инструмента HYBrite: 1. Приготовьте 280 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации (196 нл формамида/28 нл 2X SSC/56 нл очищенной H2O). 2. Включите программу холодной температуры HYBrite при 73°C. 3. Поместите 10 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации в каждую целевую область и накройте покровным стеклом. 4. При достижении HYBrite 73°C, поместите препараты на нагревательную поверхность. Закройте крышку. 5. Удалите препараты через 3 минуты. 6. Удалите покровные стекла. 7. Продолжите шаги по дегидрации в процессе приготовления целевого образца по методике количественно определения коденатурации.

Устранение неполадок

При анализе результатов количественного определения FISH, убедитесь, что ваш микроскоп правильно настроен и оптимально функционирует. В следующей таблице приведены некоторые результаты, которые вы можете получить в процессе выполнения проб LSI. Возможные причины и предложения по улучшению качества процесса приведены ниже.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Искажение морфологии хромосом	Препараты высохли слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани для сушки препаратов. Понизьте температуру сушки во время приготовления. Увеличьте время сушки до ночи при комнатной температуре, затем выдержите по крайней мере 24 часа при комнатной температуре. Не сушите препараты при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		высокой температуре.
	Образец пере-денатурирован.	Убедитесь, что раствор для денатурации был произведен согласно инструкции. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C до погружения препарата, снизьте температуру до 72°C. Уменьшите время погружения препарата в раствор на 1-3 минуты.
	Образца препаратов не до конца высохли перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образцы препаратов до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты сериями моек EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%, 100%).
	Препараты образцов слишком свежие для денатурации.	Выдержите слайды по крайней мере в течение 24 часов при комнатной температуре.
Высокий фон препарата	Стекла не достаточно очищены до приготовления препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите досуха с использованием нетканой бумаги.
	Клеточный детрит.	Отмойте клеточный детрит свежим фиксатором трижды и повторите процедуру.
	Выдерживание метафаз слишком длительное или содержит цитоплазму.	Увеличьте время погружения раствора денатурации до 10 минут.
	Препарат недостаточно отмыт в процессе гибридизации.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что pH и температура отмывочных растворов правильные. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру мойки.
Высокий фон препарата	Отмывочные растворы используются слишком долго или хранятся неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы, содержащие формамид, должны храниться при температуре при 4°C. Утилизировать через 7 дней частого использования. Утилизировать все остальные отмывочные растворы через 1 день. Убедитесь, что pH формамида составляет 7 0.8 0
	Видимая гибридизация с использованием длинных полосных фильтров.	Переключитесь на фильтры с меньшей шириной полос или мультиполосных фильтров для ограничения фонового света.
Слабый сигнал или отсутствие сигнала	Препарат образца неадекватно денатурирован.	Убедитесь, что температура раствора для денатурации в сосуде Коплина составляет 73±1°C до погружения препарата. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74°C. Увеличьте время погружения препарата в раствор для денатурации на 2-4 минуты.
	Препарат образца не достаточно подготовлен для FISH.	Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для протоколов, описывающих способ приготовления образца для FISH.
	Препараты образца неправильно выдержаны после использования.	Выдержите 24 часа при комнатной температуре до проведения FISH.
	Препараты образца не достаточно сухие перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образец до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты через серии моек в EtOH (70%, 85%, 100%).
	Образец был недостаточно смешан	Использование трипсин – Гимзе полосных образцов для FISH может потребовать регулирования полосности или протоколов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		гибридизации. Для дальнейшей информации по полосности перед FISH, свяжитесь с технической службой Abbott Molecular. Или приготовьте свежие препараты.
	Проба не добавлена	Приготовьте новую пробную смесь. Дайте пробе отмокнуть. Перемешайте реагенты, центрифугируйте. Медленно отмерьте пипеткой.
	Проба, буфер для гибридизации, и пробная смесь не были хорошо смешаны перед использованием.	Перемешайте или отмерьте пипеткой реагенты перед смешиванием, центрифугируйте.
	Пробы неправильно разведены для гибридизации.	Используйте объемы, заявленные в методике для поддержания соотношения пробной смеси (7 нл буфера для гибридизации: 1 нл пробы: 2 нл очищенной H2O). Убедитесь, что пипетка калибрована. Оставьте буфер для гибридизации на некоторое время и дайте ему достигнуть комнатной температуры перед использованием, медленно отмерьте пипеткой.
	Проба неправильно денатурирована. ПРИМЕЧАНИЕ: Не относится к пробам, поставляемым в буфере для гибридизации или денатурированном виде.	Убедитесь, что температура водяной бани использованной для денатурации пробной смеси составляет 73±1°C Денатурируйте пробную смесь в течение 5 минут.
	Проба не использована в отношении целевого образца сразу же после денатурации.	Спланируйте так, что пробы немедленно будет использована после того, как препараты извлечены из раствора 100% EtOH solution. Убедитесь, что EtOH испарился. Удалите пробирку, содержащую пробную смесь из 73±1°C водяной бани и немедленно поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C. Держите пробирку на нагревателе препаратов во время того, как отмериваете пипеткой пробу на препарат. Обработайте максимальное количество препаратов и поддерживайте правильные температуры и время обработки согласно методике.
Слабый сигнал или его отсутствие	Пробная смесь слишком сухая на препарате образца.	Немедленно поместите покровное стекло на целевую область после обработки пробной смеси. При помывке, удалите покровное стекло с 1 препарата и немедленно погрузите препарат в отмывочный раствор до удаления покровного стекла со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло путем касания поверхности пробной смеси. Поместите препарат с покровным стеклом в блоттер и мягко выдавите пузырьки воздуха.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что заявленное время и температура гибридизации были соблюдены. Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C. Закрепите покровное стекло резиновым цементом, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Условия помывки или отмывочные растворы приготовлены неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что температуры отмывочных растворов для методики соблюдены. Убедитесь, что термометры и pH метры откалиброваны правильно. Удалите покровные стекла до погружения препаратов в отмывочный раствор.
	Пробы или препараты образцов неправильно хранятся.	Храните неразведенную пробу при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Храните негибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в течение продолжительного времени или при комнатной температуре в течение короткого периода времени. Храните гибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте с течение 3 недель.
	Использован неправильный краситель. Краситель слишком яркий.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты путем погружений в EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%,100%). Высушите препараты на воздухе и снова обработайте красителем.
	Видимая гибридизация с использованием несоответствующего набора фильтров.	Наборы мультиполосных фильтров обеспечивают меньше света, чем одиночные наборы фильтров, поэтому пробные сигналы могут побледнеть при просмотре с помощью мультиполосных наборов фильтров. Используйте правильный фильтр для просмотра флуорофоров пробы. Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для получения дальнейшей информации.
	Не соответствующая результатам FISH конфигурация микроскопа, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Пробы разведены не соответствующим образом, часто слишком много пробы для количественного определения.	Убедитесь, что пробная смесь была сделана согласно инструкции.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C.
	Температура помывки слишком низкая.	Убедитесь, что буфер для гибридизации был добавлен к пробной смеси в соответствующем количестве. Поддерживайте температуру отмывочных растворов путем помещения 4 сосудов в сосуд Коплина и убедитесь, что температура отмывочного раствора правильная до мойки препаратов.
	Точность приготовления отмывочного раствора очень низкая.	Убедитесь, что отмывочные растворы были сделаны согласно инструкции. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем точнее приготовление.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Яркое или слабое окрашивание	Слабое окрашивание: препараты не достаточно дегидрированы до окрашивания или в красителе присутствуют капли масла. Неправильная концентрация красителя. ПРИМЕЧАНИЕ: краситель DAPI I в 8 раз более концентрированный, чем DAPI II. Краситель слишком старый или хранился на свету в течение продолжительного периода времени.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты серией 1-минутных моек в EtOH (70%, 85%,100%). Высушите на воздухе и снова добавьте краситель. Если окрашивание слишком яркое, разведите краситель в растворе (Список номер. 06J29-010) до использования. Храните краситель при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Библиография

1. Amare PS, Ghule P, Jose J, et al. Constitutional genomic instability, chromosome aberrations in tumor cells and retinoblastoma. Cancer Genet Cytogenet 2004;150:33-43.
2. Elnenaei MO, Hamoudi RA, Swansbury J, et al. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. Genes Chromosomes Cancer 2003;36:99-106.
3. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. Leukemia 2001;15:981-86.
4. Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. Genomics 1997;42:369-77.
5. Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J, et al. Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. Oncogene 1998;16:1891-97.
6. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genet Med 2006;8:16-23.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел молекулярно-технического обеспечения компании Эбботт (Abbott) по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт компании http://www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI RB1 (13q14.3) SpectrumOrange Probe и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента 5, 491, 224, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.). Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

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

CE

EC REP

ABBOTT GmbH & Co.KG
Max Plank-Ring 2
65205 Wiesbaden Germany

© 2006, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020 г.
30-608212/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange Probe

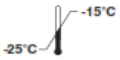
en

REF 01N34-020

30-608215/R3

Vysis LSI D13S319 (13q14.3)
SpectrumOrange Probe
REF 01N34-020
30-608215/R3

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления делеции исследуемой последовательности зонда LSI D13S319 на участке хромосомы 13q14.3.

Описание процедуры и пояснения

Повторяющаяся делеция на участке хромосомы 13q14.3 наблюдается при некоторых гемобластозах, в т.ч. при хроническом лимфоцитарном лейкозе, множественной миеломе, лимфоме из клеток мантийной зоны, диффузной крупноклеточной лимфоме, миелофиброзе, а также при наличии злокачественных новообразований в области головы, шеи и предстательной железы.[1] При

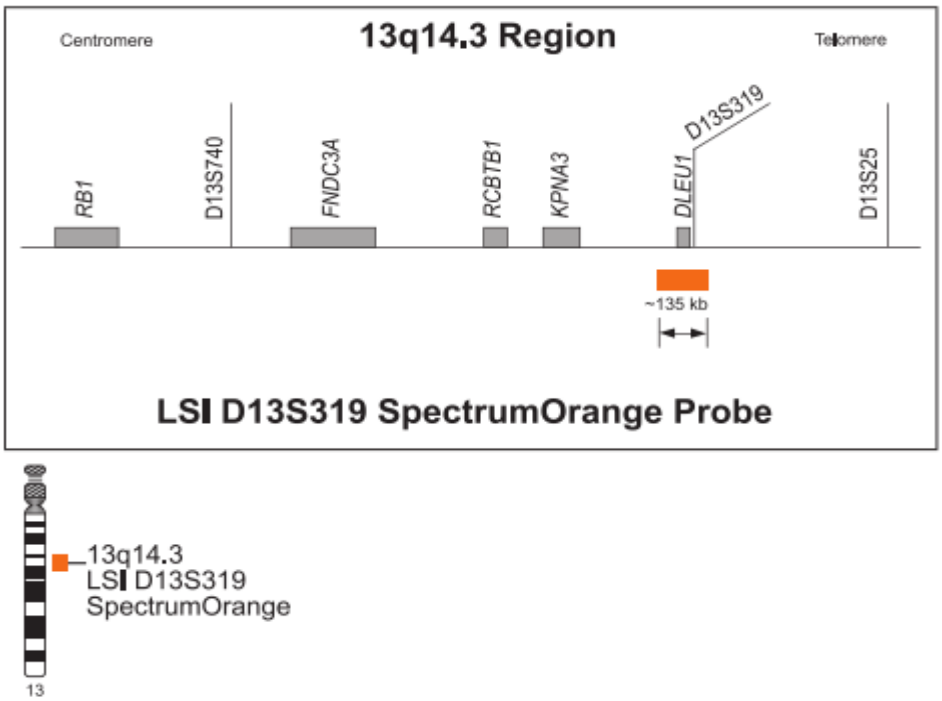
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

хроническом лимфоцитарном лейкозе наблюдаются минимальные участки делеции на участке 13q14.3, которые включают близко расположены маркеры D13S319 и D13S272[2,3] и исключают фланкирующие локусы RB1 и D13S25. Используя LSI D13S319, Reddy[4] установил, что делеция на участке 13q14.3 наблюдалась у 46 % обследованных пациентов, страдающих хроническим лимфоцитарным лейкозом. По сравнению с другими генетическими классификация изолированная делеция на участке 13q14.3 свидетельствует о благоприятном прогнозе заболевания.[5]

Согласно данным Elnenaei и др.[6] для множественной миеломы характера делеция участка размером 350 килобаз на участке 13q14.3, который включает маркер D13S319 и исключает фланкирующие локусы RB1 и D13S25. Отсутствие зонда LSI D13S319 наблюдалось у всех 29 пациентов с делецией на участке 13q14.3, выявленной с помощью FISH, тогда как делеции RB1 имели только 24 пациента, а делеции D13S25 – только 22. По данным Fonseca и др. при миеломе наблюдается отсутствие 13q, а в некоторых случаях - моносомия по 13 хромосоме. У 39 из 40 пациентов с множественной миеломой и отсутствием 13q14 обнаружена делеция RB1 и более дистальных маркеров 13q14 D13S319 и D13S25. Только у одного пациента делеция D13S319 и D13S25 сопровождалась сохранением обоих копий RB1.

Описание зонда

Зонд SpectrumOrange LSI D13S319 размером около 135 килобаз расположен на участке 13q14.3.

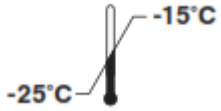


Реагенты

1. Зонд Vysis LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange (серия № 30-190045)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 100 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия хранения



Зонд Vysis LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD Предназначен только для диагностики *in vitro*.

Vysis LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C (±5°C) и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP®

Необходимые материалы (не в комплекте)
● 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
● Стеклянные сосуды Коплина
● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипеттор (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100 % этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70 % раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP® и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца
ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70 % раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100 % этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100 % этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: **для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.**
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100 % этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3 % NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4XSSC/0,3 % NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации
1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange™
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen™
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua™, SpectrumGreen и SpectrumOrange™
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[8], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ожидаемые результаты
Предполагается, что гибридизация LSI D13S319 в нормальных клетках приведет к появлению двух оранжевых сигналов, а патологические клетки, в которых отсутствует одна копия зонда LSI D13S319, будут иметь один оранжевый сигнал.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Уменьшите продолжительность размораживания.

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.

- Проведите предварительную обработку микропрепаратов:

1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида.
2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту.
3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз.
4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная	Убедитесь, что денатурационный раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	денатурация образца.	приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73 ± 1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	микропрепаратов в денатурационный раствор до 2 – 4 минут.
Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73 ± 1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºС) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºС). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Библиография

1. Corcoran MM, Hammarsund M, Zhu C, et al. DLEU2 encodes an antisense RNA for the putative bicistronic RFP2/LEU5 gene in humans and mouse. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2004;40:285-97.
2. Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 1997;42:369-77.
3. Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J, et al. Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1998;16:1891-97
4. Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridization panel. *Br J of Haematol* 2006;132:705-22.
5. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Eng J Med 2000;343:1910-16.
6. Elnenaei MO, Hamoudi RA, Swansbury J, et al. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:99-106.
7. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia* 2001;15:981-86.
8. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med* 2006;8:16-23.
9. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
10. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
12. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Vysis LSI D13S319 (13q14.3) SpectrumOrange Probe и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2006, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Май 2020 г.
30-608206/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/ CEP 15 FISH Probe Kit

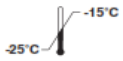
en

REF 05N35-020

30-608273/R4

Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/ CEP 15 FISH Probe Kit
REF 05N35-020
30-608273/R4

Обозначения

	Законный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Назначение

Зонд Vysis D13S319/LSI13q34 для FISH методики (набор реактивов) предназначен для выявления числа повторов в участке связывания зонда LSI D13S319, локализованных в хромосоме 13q34 и числа повторов в участке связывания зонда LSI 13q34, локализованных в хромосоме 13q34.

Краткое описание и разъяснения

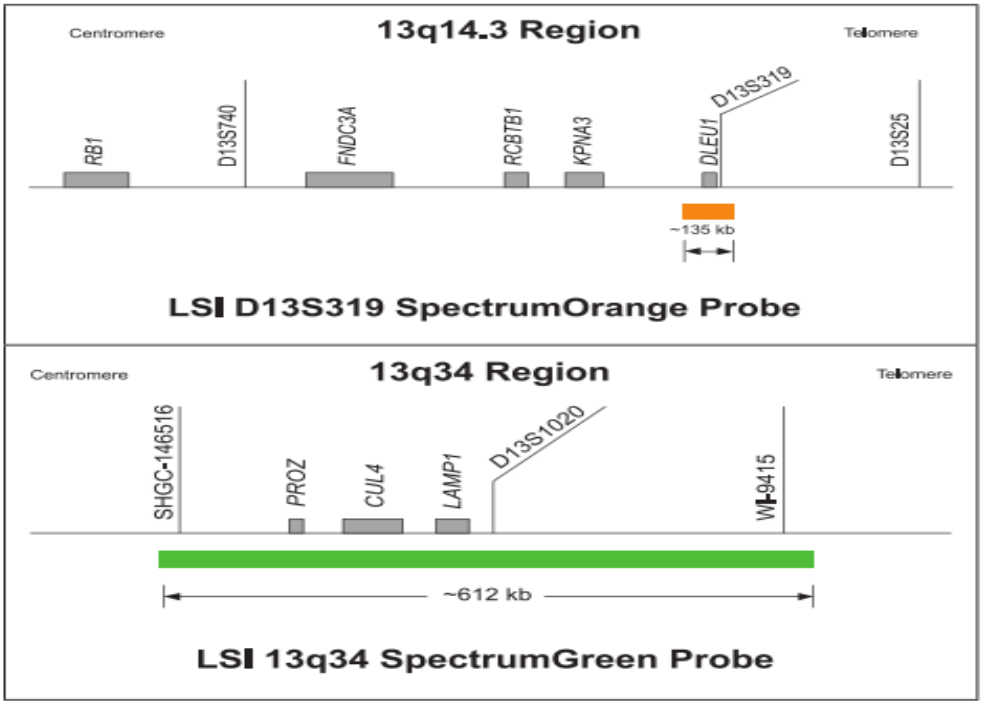
Потеря 13q или всей хромосомы 13 чаще всего встречается при множественной миеломе.[1] Avet-Loiseau et al[2] в большом исследовании использовали зонд Vysis D13S319 для того, чтобы продемонстрировать негативное влияние потери 13q на бессобытийную выживаемость и общую выживаемость больных множественной миеломой.

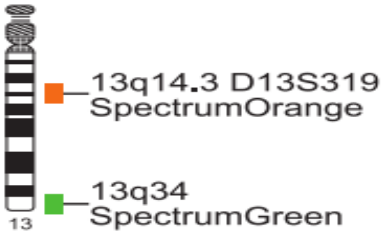
Описание зонда

Зонд SpectrumOrange D13S319, около 135 т.п.н., содержит маркер D13S319 и локализуется в хромосоме 13q34 (chr13:49500369-49635302 март 2006 UCSC Browser). Зонд SpectrumGreen, около 612 т.п.н., содержит полный ген ассоциированного с лизосомами мембранного белка (LAMP1) и локализуется в хромосоме 13q34 (chr13:12739323-113351436 март 2006 UCSC Browser).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок: сверху: центромера, участок 13q14.3, теломера; в середине: RB1, D13S740, FNDC3A, RCBTB1, KPNA3, DLEU1, D13S319, D13S25; снизу под оранжевой чертой: ~ 135 т.п.н. Подпись: зонд LSI D13S319 SpectrumOrange.





Реагенты

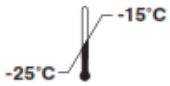
1. **Зонд Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumGreen (номер по каталогу 30-231061)**

(1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 300 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. **Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826)**

(1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0). Таблицы с данными о безопасности материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Хранение



Зонд Vysis D13S319/13q34 для FISH методики (набор реактивов) необходимо хранить при температуре -20ºC (±5°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis D13S319/13q34 для FISH методики (набор реактивов) осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[7]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCl. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смешайте 100 мл 20XSSC (pH5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)
Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC/0,3% NP-40 раствор для быстрой отмывки
Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC, в защищенном от света месте.
Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.
Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика
Необходимые материалы

- Зонды Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumGreen
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Микроцентрифуга
  - Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
  - Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
  - pH метр
  - Чистые стекла для микроскопа
  - Очищенная вода
  - Таймер
  - Вихревая мешалка (vortex)
  - Водяная баня (37ºC и 72ºC)
  - Флуоресцентный микроскоп
  - Термостат на 37ºC
  - 20X SSC
  - NP-40
  - Формамид, очень высокой степени очистки
  - Краситель DAPI II
  - Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)
ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
   1 мкл зонда
   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.
   ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.
3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
   1 мкл зонда
   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Методики контроля качества
С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Предполагаемые результаты
Ожидаемый сигнальный паттерн зонда Vysis LSI D13S319/LSI 13q34 для клеток с нормальным количеством повторов – два оранжевых сигнала и два зеленых сигнала. Предполагаемый аномальные паттерны сигналов – один оранжевый и два зеленых (паттерн делеции) или один оранжевый и один зеленый (паттерн моносомии). Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Ограничения при использовании
Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]
Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Ошибочные результаты коденатурации
Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4XSSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте время гибридизации. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2XSSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2XSSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2XSSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		денатурации составляет 73±1ºС; уменьшите ее до 72 ºС. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºС или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что значения pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºС. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		многополосные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза) (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	использованием.	центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые температуру и временные промежутки в соответствии с методикой анализа из данной инструкции.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи герметика, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH–метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºС или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºС или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºС или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многопропускные фильтры дают меньше света, чем однопропускные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многопропускных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Библиография

1. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003;101(11):4569-75.
2. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myйlome. *Blood*. 2007;109(8):3489-95.
3. 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.
4. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
5. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections:Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 (ISBN1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400 Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
7. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI D13S319/13q34 FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, 977, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.
CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все остальные торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2010, 2020 Abbott.. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020 г.
30-608273/R4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis Prader-Willi/Angelman Region SNRPN/CEP 15/PML FISH Probe Kit

en

REF 06N27-010

30-608913/R4

Vysis Prader-Willi/Angelman Region
SNRPN/CEP 15/PML FISH Probe Kit
REF 06N27-010

30-608913/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

The Vysis Prader-Willi/Angelman Region SNRPN/CEP 15/PML FISH проба предназначена для обнаружения больших распространенных делеций, включающих регион гена SNRPN на участке хромосомы 15q11-q13 с использованием метода флуоресцентной гибридизации in situ.

ОБЪЯСНЕНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

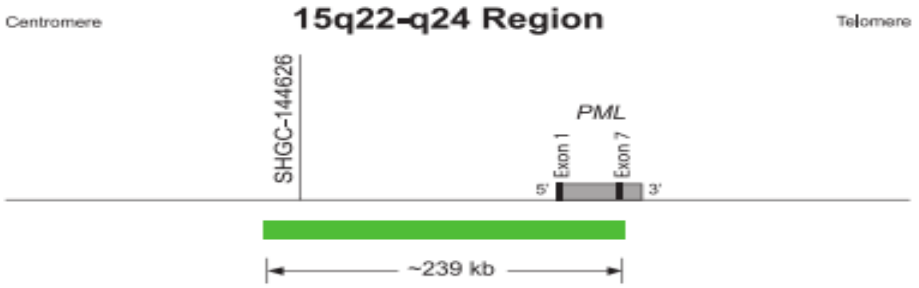
Делеция области, содержащей несколько мегабаз в пределах 15q11-q13 встречается примерно у 70% пациентов с синдромом Прадера-Вилли и синдромом Ангельмана.[3,4] Ген SNRPN находится внутри этого делеционного региона. SpectrumAqua CEP 15 и SpectrumGreen PML в сочетании с SNRPN производили сигналы в ожидаемых локусах на обоих гомологичных хромосомах 15 в более чем 200 метафазных клетках, включая нормальные, 15q11-q13 интерстициальные делеции и дупликации 15q11-q13 на образцах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

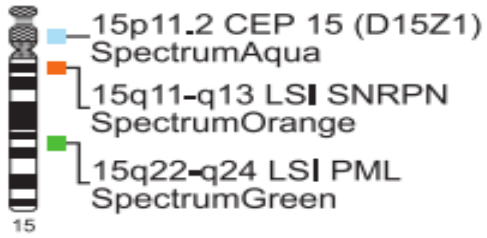
ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером примерно 125 килобаз (chr15:22716001-22841074; Март 2006, браузер генома)[5] SpectrumOrange LSI SNRPN проба охватывает локус SNURF-SNRPN на хромосомном регионе 15q11-q13. Размером примерно 239 килобаз (chr15:71877721-72116436; март 2006, браузер генома)[5] проба LSI PML SpectrumGreen располагается в хромосомном регионе 15q22-q24.
SpectrumAqua CEP 15 (D15Z1) проба локализуется на хромосоме в регионе 15p11.2.

LSI SNRPN SpectrumOrange Probe



LSI PML SpectrumGreen Probe



РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI SNRPN SpectrumOrange/CEP 15 SpectrumAqua/PML SpecrtumGreen Probes (Номер партии 30-231047)

(1 флакон, 10 мкл/флакон). 605 нг/мкл, меченая флуорохромом ДНК-проба и блокирующая ДНК в ТРрис-ЭДТА.

2. Vysis LSI/WCP Гибридизационный буфер (Номер партии 30-804824)

(1 флакон, 150 мкл на флакон). Сульфат декстарана, формамид, SSC (pH 7.0).

Таблицы с данными о безопасности материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение

Vysis Prader-Willi/Angelman Region SNRPN/CEP 15/PML FISH
Хранится при температуре -20°C (±10°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis Prader-Willi/Angelman Region SNRPN/CEP 15/PML FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI SNRPN SpectrumOrange/CEP 15 SpectrumAqua/PML SpecrtumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки:

• Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ: Только для профессиональных пользователей. Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор
Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)
Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC / 0,3% NP-40 раствор для быстрой отмывки
Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.
Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC (±10°C), в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика

Необходимые материалы

- Vysis LSI SNRPN SpectrumOrange/CEP 15 SpectrumAqua/PML SpecrtumGreen Probes
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы
- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.

2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
2. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
3. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
4. Извлеките пробирку из водяной бани.
5. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация –это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1.Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.

2.Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.

3.По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.

4.Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.

5.Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Предполагаемые результаты

Ожидаемый сигнальный паттерн зонда Vysis Prader-Willi/Angelman Region SNRPN/CEP 15/PML FISH– это два оранжевых сигнала, и два голубых и два зеленых сигнала.

Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для зонда Vysis Prader-Willi/Angelman Region SNRPN/CEP 15/PML FISH – это один оранжевый, два голубых и два зеленых сигнала.

Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[6].

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Увеличьте продолжительность гибридизации.
	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Glenn CC, Driscoll DJ, Yang TP, et al. Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(4): 321-332.
2. Cassidy SB and Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:3-13.
3. Stumm M, Tonnies H, and Wieacker PF. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. *Eur J Pediatr.* 1999;158:531-536.
4. Tekin M, Jackson-Cook C, Buller A, et al. Fluorescence in situ hybridization detectable mosaicism for Angelman Syndrome with
biparental methylation. *Am J Med Genet.* 2000;95:145-149.
5. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
6. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med.* 2006;8(1):16-23.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
10. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI SNRPN SpectrumOrange/CEP 15 SpectrumAqua/PML SpecrtumGreen Probes защищены Европейскими патентами EP 0 549 709 B1 и дающего Abbott Molecular эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2010, 2020 Эббот Лабораториз
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608913/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis Prader-Willi/Angelman Region D15S10/CEP 15/PML FISH Probe Kit en

REF 05N58-010

30-608296/R3

Vysis Prader-Willi/Angelman Region
D15S10/CEP 15/PML FISH Probe Kit
REF 05N58-010
30-608296/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-10°C -30°C	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis Prader-Willi/Angelman Region D15S10/CEP 15/PML FISH Probe Kit предназначена для выявления больших делеций, включающих маркер D15S10 на хромосоме 15q11-q13 с использованием флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

Описание процедуры и пояснения

Делеция в несколько мегабаз региона, включающего 15q11-q13 встречается примерно у 70% пациентов с синдромом Прадера-Вилли и синдромом Ангельмана.[1,2] Маркер D15S10 STS, находящийся внутри гена UBEA3A, лежит в этом делеционном регионе[1].

Vysis Prader-Willi/Angelman Region SpectrumOrange D15S10 проба используется в публикациях для детекции интерстициальных делеций региона 15q11-q13[3,4]. SpectrumAqua CEP 15 и SpectrumGreen PML в сочетании с D15S10 производят сигналы в ожидаемых локусах на 15 гомологичной хромосоме в более чем 200 метафазных клетках, включающих как нормальные так 15q11-q13 интерстициальные делеции и 15q11-q13 дупликации.

Описание зонда

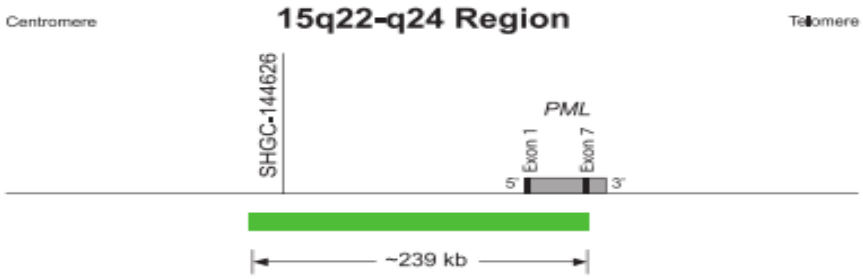
Размером приблизительно 180 kb (chr15: 23083412-23263141; март 2006 г., браузер генома UCSC)[5] SpectrumOrange LSI D15S10 проба охватывает ген UBEA3A на хромосоме 15q11-q13.

Размером приблизительно 239 kb (chr15: 71877721-72116436; март 2006 г., браузер генома UCSC) SpectrumGreen PML проба локализуется на хромосоме 15q22-q24.

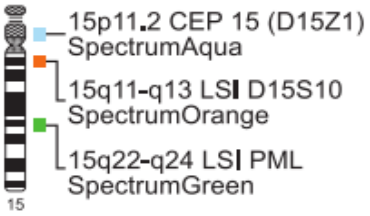
SpectrumAqua CEP 15 (D15Z1) проба локализована на хромосоме 15p11.2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

LSI D15S10 SpectrumOrange Probe



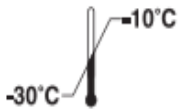
LSI PML SpectrumGreen Probe



Реагенты

1. Зонд Vysis LSI D15S10 SpectrumOrange / CEP 15 SpectrumAqua/ PML SpectrumGreen Probes (серия №30-231072)
(1 флакон, 10 мкл/флакон). 605 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804824)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ



Vysis Prader-Willi/Angelman Region D15S10/CEP 15/PML FISH Probe Kit должна храниться при -20°C (±10°C) в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Vysis LSI D15S10 SpectrumOrange/CEP 15 SpectrumAqua/PML SpectrumGreen проба транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Предназначен только для диагностики *in vitro*.
Vysis LSI/WCP гибридизационный буфер классифицируется в соответствии с применимыми директивами Европейского сообщества как: Токсичный (T). Ниже приведены соответствующие факторы риска (Р) и безопасности (Б):

R41	Риск серьезного поражения глаз
R61	Может нанести вред плоду
S45	В случае если что-то произойдет, или при плохом самочувствии, обратитесь к врачу незамедлительно (покажите лейблу по возможности)
S53	Избегайте воздействия – пользуйтесь специальными инструкциями перед использованием

Подготовка реагентов
При необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1% NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20XSSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0±0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70% формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20XSSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0– 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения–7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C (±10°C) и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI D15S10 SpectrumOrange / CEP 15 SpectrumAqua/ PML SpectrumGreen
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP®

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид ультравысокой очистки
- Контрастирующий краситель DAPI II
- Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца
ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70 % раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100 % этанолом (1 мин.).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100 % этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.

ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации
1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange™
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen™
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua™, SpectrumGreen и SpectrumOrange™
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация
Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации
Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Ожидаемые результаты
Ожидаемые нормальные паттерны сигналов для набора зондов Vysis Prader-Willi/Angelman регион D15S10 /CEP 15/PML - два оранжевых, два голубых и два зеленых сигнала. Ожидаемый паттерн абнормального сигнала Vysis Prader-Willi Angelman регион D15S10 /CEP 15/PML - один оранжевый, два голубых и два зеленых сигнала. Другие паттерны аномальных сигналов могут также возникать, и метафазный анализ может быть полезен для характеристики такие паттернов.

Ограничения при использовании
Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]
Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[6].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

некоторое время после денатурации.	нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºС) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºС). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
	Контрастирующее окрашивание выглядит	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Glenn CC, Driscoll DJ, Yang TP, and Nicholls RD. Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(4):321-32.
2. Cassidy SB and Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:3-13.
3. Tekin M, Jackson-Cook C, Buller A, et al. Fluorescence in situ hybridization detectable mosaicism for Angelman Syndrome with biparental methylation. *Am J Med Genet.* 2000;95:145-9.
4. Sathanoori M, Hu J, Murthy V, et al. Cryptic duplication of 12q24.33 qter in a child with Angelman syndrome-simultaneous occurrence of two unrelated cytogenetic events. *Am J Med Genet.* 2007;143A:985-94.
5. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
6. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI D15S10 SpectrumOrange / CEP 15 SpectrumAqua/ PML SpectrumGreen Tri Color Probes Probes защищены Европейскими патентами EP 0 549 709 B1 и дающего Abbott Molecular эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2010, 2020 Abbott. Все права защищены.

www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608296/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe Kit

en

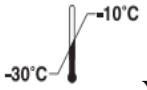
REF 05N52-020

30-608290/R6

Vysis 4q12 Tri-Color
Rearrangement FISH Probe Kit
REF 05N52-020
30-608290/R6

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe Kit предназначена для выявления перестроек в хромосоме 4q12, включающий ген FIP1L1-PDGFRA с использованием флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ) описан Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) как новообразование, в котором клональная пролиферация предшественников эозинофилов приводит к длительной эозинофилии[1]. Хромосомная аномалия, del(4) q(12q12) приводит к слиянию FIP1L1 и PDGFRA генов и встречается у 40-60% пациентов с ХЭЛ[2]. Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe используется для детекции делеции размером приблизительно 800 kb, содержащей LNX и CHIC2 и последующим слиянием FIP1L1 и PDGFRA[3] генов. Текущая система классификация ВОЗ относит миелопролиферативные новообразования с эозинофилией и аномалии PDGFRA и PDGFRB или FGFR1 в их собственную диагностическую категорию, в то время как в ХЭЛ такие абберации отсутствуют и несколько других генов попадают в ХЭЛ если иное не указано в классификации[1].

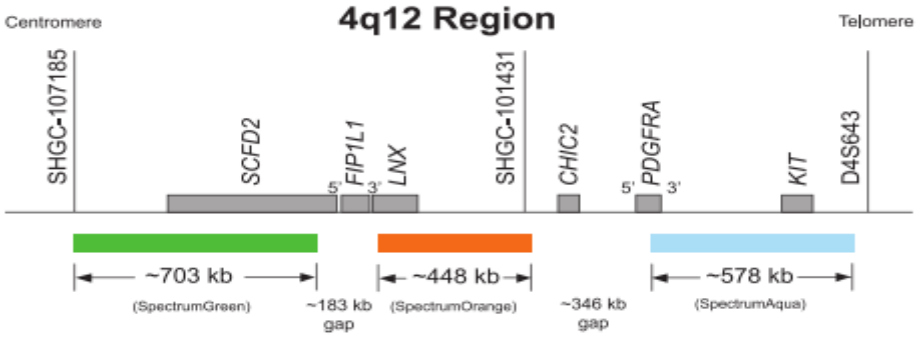
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

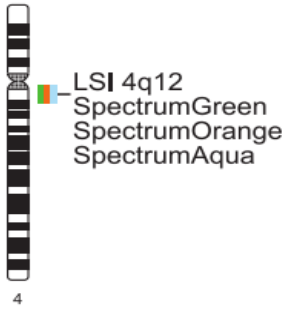
Зонд SpecrtumGreen размером приблизительно 703 кб (chr4: 53159272-5386-2621; Март 2006)[4] и локализован в центромерной части гена FIP1L1.

Зонд SpecrtumOrange размером приблизительно 448 кб (chr4: 54045936-54493304; Март 2006)[4] локализован между генами FIP1L1 и CHIC2.

Зонд SpecrtumAqua размером приблизительно 578 кб (chr4: 54840090-55418505; Март 2006)[4] и простирается от теломерного конца гена PDGFRA за пределы области гена KIT.



Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe



РЕАГЕНТЫ

1. **Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe (номер серии №30-231042)**

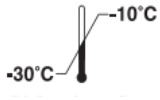
(1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 425 нг/мкл Флуорофор-маркированная проба ДНК и ДНК блокированная в трис-ЭДТА)

2. **Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации (Серийный номер 30-804824)**

(1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Паспорта безопасности на все предоставленные реагенты можно получить в Службе технической поддержки Abbott Molecular.

Инструкции по хранению



Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe хранится при -20°C (±10°C) в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ВНИМАНИЕ: Только для профессиональных пользователей. Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCl. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)
Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC / 0,3% NP-40 раствор для быстрой отмывки
Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.
Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC (±10°C), в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика

Необходимые материалы

- Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы
- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов
1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
   1 мкл зонда
   2 мкл очищенной воды

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
2. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
3. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
4. Извлеките пробирку из водяной бани.
5. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление промывочных растворов:

• Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
• Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.
ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация –это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры
Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.
При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

Параметры
Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.
При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.
1.Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2.Установите Ннн Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3.По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4.Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5.Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Методики контроля качества
С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.
Предполагаемые результаты
Ожидаемый сигнальный паттерн зонда Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe это два трехцветных слитных сигнала – зеленый/оранжевый/голубой. Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для зонда Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement - один слитный трехцветный - зеленый/оранжевый/голубой и один слитный зеленый/голубой - для делеции промежуточной области и слияния генов FIP1L1 и PDGFRA.[3] При встречающихся интерстициальных транслокациях генов LNX и CHIC2 - атипичный интересующий паттерн – это слитный трехцветный сигнал - зеленый/оранжевый/голубой, один слитный зеленый/голубой сигнал и один оранжевый сигнал.[3] Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Ограничения при использовании
Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]
Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[6].

Ошибочные результаты коденатурации
Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Swerdlow SH, Campo E, and Harris NL et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. *International Agency for Research on Cancer, Lyon.* 2008;51,68-73.
2. Heim S and Mitelman F. *Cancer Cytogenetics.* 3rd edition Hoboken New Jersey: Wiley-Blackwell; 2009:219.
3. Fink SR, Belongie KJ, Paternoster SF, et al. Validation of a new three-color fluorescence in situ hybridization (FISH) method to detect CHIC2 deletion, FIP1L1/PDGFRA fusion and PDGFRA translocations. *Leukemia Research.* 2009:33(6)843–846.
4. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006
5. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med.* 2006;8(1):16-23.
6. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
9. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe защищены Европейскими патентами EP 0 549 709 B1 и дающего Abbott Molecular эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2010, 2020 Эббот Лабораториз
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608290/R6

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI ATM (11q22.3) SpectrumOrange Probe

en

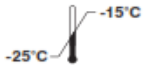
REF 01N33-020

30-608214/R3

Vysis LSI ATM (11q22.3)
SpectrumOrange Probe
REF 01N33-020

30-608214/R3

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Этот зонд для проведения флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) предназначен для выявления делеции целевой последовательности зонда LSI ATM, содержащей ген ATM, локализованный на хромосоме 11q22.3.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

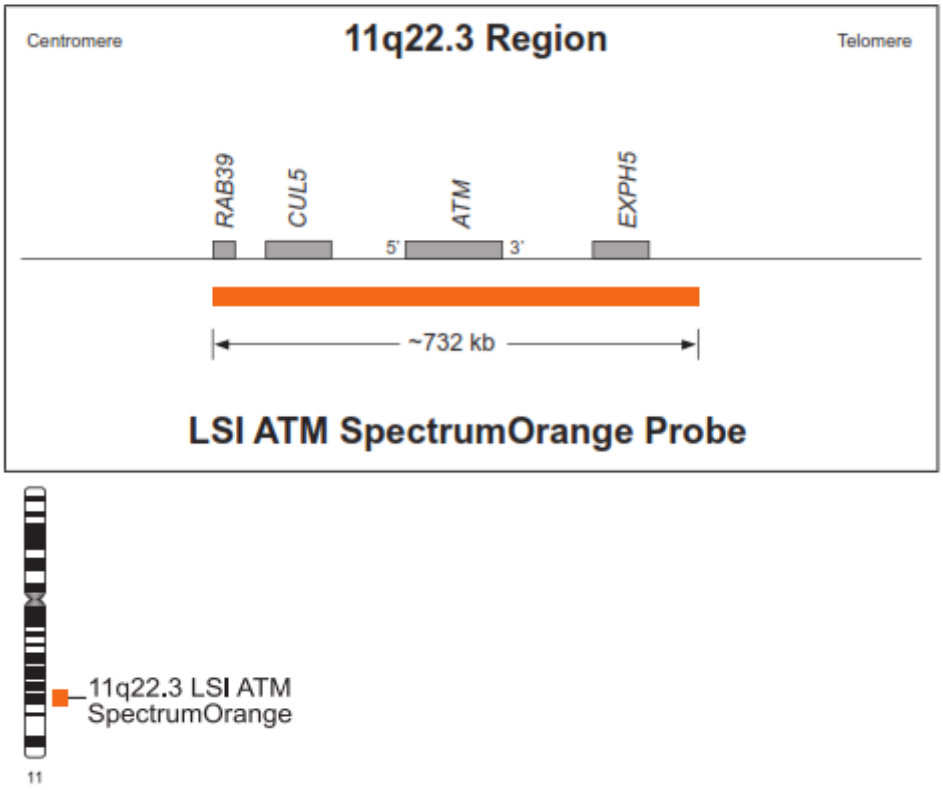
Потеря генетической информации на участке хромосомы 11q22-q24 наблюдается при ряде злокачественных новообразований. Делеция в этом регионе это наиболее распространённая аномалия, встречающаяся при таких типах нарушений как лимфопролиферативные заболевания. При хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) потеря 11q22.3-q23.1 - одна из наиболее часто встречающихся хромосомных аббераций.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

С использованием метода FISH –диагностики был охарактеризован и проанализирован регион делеции размером 2-3 мегабазы, содержащий гены ATM, RDX и FDX[1]. Потеря данного региона ассоциирована с выраженной лимфаденопатией и неблагоприятным прогнозом[2,3]. Благодаря своему расположению и роли белкового продукта в регуляции p53, ATM является геном-кандидатом на клинический эффект делеции 11q при ХЛЛ[4,5].

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

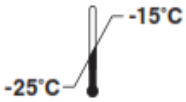
Зонд SpecrtumOrange LSI ATM размером приблизительно 732 кб, содержит полный ген ATM и локализован в регионе 11q22.3.



РЕАГЕНТЫ

1. **Vysis LSI ATM (11q22.3) SpectrumOrange Probe (номер партии 30-190017)** (1 флакон, 20 мкл/флакон). 50 нг/мкл, меченая флуорохромом ДНК-проба и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА.
2. **Vysis LSI/WCP Гибридизационный буфер (Номер партии 30-804826)**

ХРАНЕНИЕ



Vysis LSI ATM (11q22.3) SpectrumOrange хранится при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI ATM (11q22.3) SpectrumOrange

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор
Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCl. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор

Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)

Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)

Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC/0,3% NP-40 раствор для быстрой отмывки

Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC, в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу

Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика

Необходимые материалы

- Vysis LSI ATM (11q22.3) SpectrumOrange
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов
1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
2. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
3. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
4. Извлеките пробирку из водяной бани.
5. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация –это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры
Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.
При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.
1.Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2.Установите Ннни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3.По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4.Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5.Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.
Предполагаемые результаты

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация LSI ATM с нормальными клетками приведет к образованию двух оранжевых сигналов. Атипичные клетки с потерей копии гена LSI ATM будут иметь одиночный оранжевый сигнал.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ограничения при использовании
Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]
Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[6].

Ошибочные результаты коденатурации
Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	микропрепараты недостаточно высушены.	70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºС в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, et al. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-q23.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93:11837-41.
2. Dohner H, Stilgenbauer S, James, MR, et.al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997:89(7):2516-22.
3. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2000;343:1910-16.
4. Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, et al. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimunnotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol* 2006;24:437-43.
5. 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.
6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI Vysis LSI ATM (11q22.3) SpectrumOrange Probe и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,491,224, приписанными Abbott Molecular.

Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2006, 2020 Abbott Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020 г.
30-608214/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 05N46-020

30-608284/R5

Vysis RARA Break Apart
FISH Probe Kit
REF 05N46-020
30-608284/R5

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Биологический риск
	Опасность
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit предназначена для детекции хромосомных перестроек, включающих регион гена RARA на участке хромосомы 17q21 с использованием флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) связан с хромосомными перестройками с участием гена рецептора ретиноевой кислоты α RARA на хромосоме 17q21 и вариабельными генами-партнерами.[1,3,4] В подавляющем большинстве случаев ОПЛ ген RARA сливается с геном промиелоцитарного лейкоза (PML), расположенном на хромосоме 15q22, приводящий к транслокации (15;17). Было также описаны гены - слияния RARA при промиелоцитарном лейкозе с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

цинковыми пальцами, (PLZF, 11q13), нуклеофозмин (NPM, 5q35), ядерный митотический аппарат (NuMA, 11q23), преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5b (STAT5B, 17q21) PRKAR1A (протеинкиназа, цАМФ-зависимая, регуляторного типа I, альфа, 17q23-q24).
Набор зондов Vysis RARA Break FISH использовался в нескольких исследованиях по обнаружению перестроек в хромосоме 17q21, включающим ген RARA.[4,5,6,7]

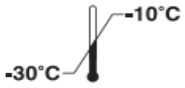
ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером приблизительно 150 кб (chr17:35612650-35762683; Март 2006, Геномный браузер) проба SpectrumOrange лежит в основном в центромерной области точки разрыва гена RARA, которая встречается в интроне 2[1,2]. Проба простирается на 4 кб теломеры за пределы интрона 2. Размером приблизительно 417 кб (chr17:35762877-36180271, Март 2006, Геномный браузер)[8] SpectrumGreen проба размещается теломерно к точке разрыва региона гена RARA.

РЕАГЕНТЫ

1. Зонд Vysis LSI RARA Dual Color Break Apart Rearrangement (серия № 30-191011)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 400 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804824)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).
Таблицы с данными о безопасности материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Хранение



Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit хранится при температуре -20°C (±10°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Медицинское оборудование для диагностики in vitro
Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis LSI RARA Dual Color Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[10], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[11], CLSI документ M29-A3[12], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[13].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[10]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[13].

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки:
• Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика

Необходимые материалы

- Vysis LSI RARA Dual Color Rearrangement Probe
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы
- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов
1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация –это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры
Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.
При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.
1.Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2.Установите Ннн Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3.По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4.Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5.Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.
Предполагаемые результаты
Ожидаемый нормальный паттерн сигналов для Vysis LSI RARA Color Break Apart Rearrangement – это два слитных сигнала. Ожидаемый атипичный паттерн сигналов для зонда Vysis LSI RARA Color

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Break Apart Rearrangement это один оранжевый, один зеленый и один слитный сигналы. Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[6].

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида.
2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту.
3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз.
4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	поместите ее подогревательный столик (45–50ºС). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

красителе присутствуют капли масла.	этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Redner R. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. Review. *Leukemia.* 2002;16:1927-32.
2. Hasan S, Mays A, Ottone T, et al. Molecular analysis of t(15;17) genomic breakpoints in secondary acute promyelocytic leukemia arising after treatment of multiple sclerosis. *Blood.* 2008;112: 338390.
3. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood.* 2000;96:1297-1308.
4. Catalano A, Dawson M, Somana K, et al. The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 2007;110:4073-76.
5. Park TS, Kim JS, Song J, et al. Acute promyelocytic leukemia with insertion of PML exon 7a and partial deletion of exon 3 of RARA: a novel variant transcript related to aggressive course and not detected with real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2009;188:103-107.
6. Kang L, Smith S, Kaiser-Rogers K, et al. Two cases of acute myeloid leukemia with t(11;17) associated with varying morphology and immunophenotype: rearrangement of the MLL gene and a region proximal to the RARα gene. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2005;159:168-173.
7. Lee G, Christina S, Tien S, et al. Acute promyelocytic leukemia with PML-RARA fusion on i(17q) and therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2005;159:129-136.
8. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
9. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med.* 2006;8(1):16-23.
10. US Department of Health and Human Services. B*iosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. *Type*> www.cdc.gov, *search*>BMBL5>*look up* sections III and IV.]
11. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
13. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI RARA Dual Color Break Apart Rearrangement Probe защищены Европейскими патентами EP 0 549 709 B1 и дающего Abbott Molecular эксклюзивное право.
CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2010, 2020 Abbott. Все права защищены.

www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608284/R5

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IGH/CCND1 DF FISH Probe Kit

en

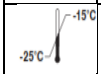
REF 08L58-020

30-608309/R5

Vysis IGH/CCND1
DF FISH Probe Kit
REF 08L58-020
30-608309/R5

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

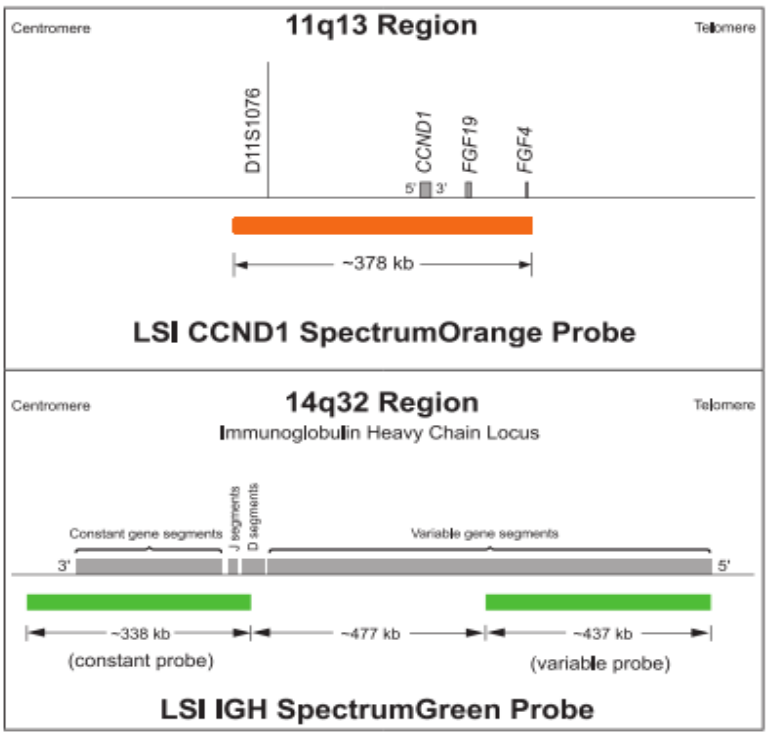
Данные зонды для проведения флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) предназначена для детекции рицепрокной транслокации t(11;14) (q13;q32) с участием генов IGH и CCND1.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Лимфома из клеток мантийной зоны обычно ассоциируется со сбалансированной транслокацией t(11;14) (q13;q32)[1]. Лимфома из клеток мантийной зоны имеет наиболее агрессивное клиническое течение среди мелкоклеточных лимфом. Метод FISH стал важным методом в диагностике мантийных клеточных лимфом[1-3]. Vysis LSI IGH/CCND1 Dual Color Dual Fusion Probes использовалась в публикациях для детекции лимфом из клеток мантийной зоны[3,4].

Размером приблизительно 378 кб SpectrumOrange проба охватывает ген CCND1 (chr: 68927577-69305335; Март 2006, Геномный браузер). SpectrumGreen проба состоит из двух проб; 1 IGH проба гибридизуется с областью приблизительно 338 т.п.н., охватывающей константную область гена IGH и другая IGH проба размером приблизительно 437 кб и гибридизуется с теломерной частью вариабельной области IGH (chr: 105901997-106339460; Март 2006, Геномный браузер). Между двумя пробами существует разрыв приблизительно 477 кб.

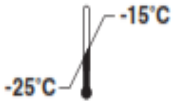
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



РЕАГЕНТЫ

1. Зонд Vysis LSI IGH/CCND1 Dual Color Dual Fusion Probes (серия №30-191017)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 600 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ



Vysis LSI IGH/CCND1 DF FISH Probe Kit должна храниться при -20°C (±5°C) в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Vysis LSI Vysis LSI IGH/CCND1 DF FISH Probe Kit проба транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI IGH/CCND1 Dual Color Dual Fusion Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света.
Разрушение: под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Залитые в формалин, заключенные в парафин образцы опухолевой ткани помещались на слайды с использованием стандартных цитогенетических процедур.
Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI IGH/CCND1 Dual Color Dual Fusion Probes
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP®

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Приготовление целевого образца
ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.
1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погружайте не более, чем 4 препарата одновременно.
3. Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

Приготовление пробной смеси
1. Добавьте следующие ингредиенты для каждой целевой области, в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.
2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73±1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.
1. Уберите препараты из 100% EtOH.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов. Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Методика быстрой помывки
ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2XSSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:
- Налейте 70 мл 0.4XSSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.

- Налейте 70 мл 2XSSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.
1. Удалите покровное стекло одного препарата и немедленно погрузите препарат в 0.4X SSC/0.3% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Повторите эту манипуляцию с каждым препаратом.
2. Удалите препараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температуре отмывочного раствора составляет 73±1°C до помывки других препаратов.
3. Погрузите препараты в 2XSSC/0.1% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Удалите препараты через 5 секунд - 1 минуту.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: Препараты, которые хранятся при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте могут быть проанализированы в течение, по крайней мере, 3 недель после гибридизации.

Использование коденатурации
Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения препаратов образцов с пробами и покровными стеклами, на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, препараты удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Опис

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

анные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
2 мкл очищенной H_2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H_2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite™. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite™ может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа-или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл красителя в целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена с использованием соответствующих контролей и аналитических методик [6] наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования.

Ожидаемые результаты

Ожидаемый нормальный сигнал для пробы Vysis LSI IGH/CCND1 Dual Color Dual Fusion это два оранжевых и два зеленых сигнала. Ожидаемый абнормальный сигнал для пробы Vysis LSI IGH/CCND1 Dual Color Dual Fusion один оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала. Могут возникать и другие нетипичные сигналы, и метафазный анализ может быть полезен для характеристики таких сигналов.

Устранение неисправностей в отношении результатов количественного определения коденатурации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Морфология хромосомы, наблюдаемая во время гибридизации с применением коденатурации, может отличаться от образца, который был денатурирован и дегидрирован до применения пробы.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C.
Тусклая проба	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Увеличьте время гибридизации • Повысьте температуру плавления. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как морфология станет приемлемой. • Отмойте слайд с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 70-73°C.
Диффузный сигнал	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Отмойте с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 73-76°C.
Плохая морфология метафазы	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Снизьте температуру плавления на 2°C. • Снизьте время плавления • ПРИМЕЧАНИЕ: При необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Предварительно обработайте препараты: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите препарат в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3.Погрузите препарат несколько раз в очищенную воду. 4. Дегидрируйте препараты путем нескольких моек в EtOH длительностью 1 минута (70%, 85%, 100%). 5. Высушите препараты на воздухе и продолжайте приготовления препарата для коденатурации. • Если морфология продолжает оставаться плохой, модифицируйте использование инструмента HYBrite: 1. Приготовьте 280 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации (196 нл формамида/28 нл 2X SSC/56 нл очищенной H2O). 2. Включите программу холодной температуры HYBrite при 73°C. 3. Поместите 10 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации в каждую целевую область и накройте покровным стеклом. 4. При достижении HYBrite 73°C, поместите препараты на нагревательную поверхность. Закройте крышку. 5. Удалите препараты через 3 минуты. 6. Удалите покровные стекла. 7. Продолжите шаги по дегидрации в процессе приготовления целевого образца по методике количественно определения коденатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение неполадок

При анализе результатов количественного определения FISH, убедитесь, что ваш микроскоп правильно настроен и оптимально функционирует. В следующей таблице приведены некоторые результаты, которые вы можете получить в процессе выполнения проб LSI. Возможные причины и предложения по улучшению качества процесса приведены ниже.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Искажение морфологии хромосом	Препараты высохли слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани для сушки препаратов. Понизьте температуру сушки во время приготовления. Увеличьте время сушки до ночи при комнатной температуре, затем выдержите, по крайней мере, 24 часа при комнатной температуре. Не сушите препараты при высокой температуре.
	Образец пере-денатурирован.	Убедитесь, что раствор для денатурации был произведен согласно инструкции. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C до погружения препарата, снизьте температуру до 72°C. Уменьшите время погружения препарата в раствор на 1-3 минуты.
	Образца препаратов не до конца высохли перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образцы препаратов до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты сериями моек EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%, 100%).
	Препараты образцов слишком свежие для денатурации.	Выдержите слайды, по крайней мере, в течение 24 часов при комнатной температуре.
Высокий фон препарата	Стекла не достаточно очищены до приготовления препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите досуха с использованием нетканой бумаги.
	Клеточный детрит.	Отмойте клеточный детрит свежим фиксатором трижды и повторите процедуру.
	Выдерживание метафаз слишком длительное или содержит цитоплазму.	Увеличьте время погружения раствора денатурации до 10 минут.
	Препарат недостаточно отмыт в процессе гибридизации.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что pH и температура отмывочных растворов правильные. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру мойки.
Высокий фон препарата	Отмывочные растворы используются слишком долго или хранятся неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы, содержащие формамид, должны храниться при температуре при 4°C. Утилизировать через 7 дней частого использования. Утилизировать все остальные отмывочные растворы через 1 день. Убедитесь, что pH формамида составляет 7 0.8 0
	Видимая гибридизация с использованием длинных полосных фильтров.	Переключитесь на фильтры с меньшей шириной полос или мультиполосных фильтров для ограничения фонового света.
Слабый сигнал или отсутствие сигнала	Препарат образца неадекватно денатурирован.	Убедитесь, что температура раствора для денатурации в сосуде Коплина составляет 73±1°C до погружения препарата. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74°C. Увеличьте время погружения препарата в раствор для денатурации на 2-4 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Препарат образца не достаточно подготовлен для FISH.	Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для протоколов, описывающих способ приготовления образца для FISH.
	Препараты образца неправильно выдержаны после использования.	Выдержите 24 часа при комнатной температуре до проведения FISH.
	Препараты образца не достаточно сухие перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образец до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты через серии моек в EtOH (70%, 85%, 100%).
	Образец был недостаточно смешан	Использование трипсин – Гимзе полосных образцов для FISH может потребовать регулирования полосности или протоколов гибридизации. Для дальнейшей информации по полосности перед FISH, свяжитесь с технической службой Abbott Molecular. Или приготовьте свежие препараты.
	Проба не добавлена	Приготовьте новую пробную смесь. Дайте пробе отмокнуть. Перемешайте реагенты, центрифугируйте. Медленно отмерьте пипеткой.
	Проба, буфер для гибридизации, и пробная смесь не были хорошо смешаны перед использованием.	Перемешайте или отмерьте пипеткой реагенты перед смешиванием, центрифугируйте.
	Пробы неправильно разведены для гибридизации.	Используйте объемы, заявленные в методике для поддержания соотношения пробной смеси (7 нл буфера для гибридизации: 1 нл пробы: 2 нл очищенной H2O). Убедитесь, что пипетка калибрована. Оставьте буфер для гибридизации на некоторое время и дайте ему достигнуть комнатной температуры перед использованием, медленно отмерьте пипеткой.
	Проба неправильно денатурирована. ПРИМЕЧАНИЕ: Не относится к пробам, поставляемым в буфере для гибридизации или денатурированном виде.	Убедитесь, что температура водяной бани использованной для денатурации пробной смеси составляет 73±1°C Денатурируйте пробную смесь в течение 5 минут.
	Проба не использована в отношении целевого образца сразу же после денатурации.	Спланируйте так, что пробы немедленно будет использована после того, как препараты извлечены из раствора 100% EtOH solution. Убедитесь, что EtOH испарился. Удалите пробирку, содержащую пробную смесь из 73±1°C водяной бани и немедленно поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C. Держите пробирку на нагревателе препаратов во время того, как отмериваете пипеткой пробу на препарат. Обработайте максимальное количество препаратов и поддерживайте правильные температуры и время обработки согласно методике.
Слабый сигнал или его отсутствие	Пробная смесь слишком сухая на препарате образца.	Немедленно поместите покровное стекло на целевую область после обработки пробной смеси. При помывке, удалите покровное стекло с 1 препарата и немедленно погрузите препарат в отмывочный раствор до удаления покровного стекла со следующего препарата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло путем касания поверхности пробной смеси. Поместите препарат с покровным стеклом в блоттер и мягко выдавите пузырьки воздуха.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что заявленное время и температура гибридизации были соблюдены. Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C. Закрепите покровное стекло резиновым цементом, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Условия помывки или отмывочные растворы приготовлены неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что температуры отмывочных растворов для методики соблюдены. Убедитесь, что термометры и pH метры откалиброваны правильно. Удалите покровные стекла до погружения препаратов в отмывочный раствор.
	Пробы или препараты образцов неправильно хранятся.	Храните неразведенную пробу при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Храните негибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в течение продолжительного времени или при комнатной температуре в течение короткого периода времени. Храните гибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте с течение 3 недель.
	Использован неправильный краситель. Краситель слишком яркий.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты путем погружений в EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%,100%). Высушите препараты на воздухе и снова обработайте красителем.
	Видимая гибридизация с использованием несоответствующего набора фильтров.	Наборы мультиполосных фильтров обеспечивают меньше света, чем одиночные наборы фильтров, поэтому пробные сигналы могут побледнеть при просмотре с помощью мультиполосных наборов фильтров. Используйте правильный фильтр для просмотра флуорофоров пробы. Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для получения дальнейшей информации.
	Не соответствующая результатам FISH конфигурация микроскопа, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Пробы разведены не соответствующим образом, часто слишком много пробы для количественного определения.	Убедитесь, что пробная смесь была сделана согласно инструкции.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C.
	Температура помывки слишком низкая.	Убедитесь, что буфер для гибридизации был добавлен к пробной смеси в соответствующем количестве.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Поддерживайте температуру отмывочных растворов путем помещения 4 сосудов в сосуд Коплина и убедитесь, что температура отмывочного раствора правильная до мойки препаратов.
	Точность приготовления отмывочного раствора очень низкая.	Убедитесь, что отмывочные растворы были сделаны согласно инструкции. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем точнее приготовление.
Яркое или слабое окрашивание	Слабое окрашивание: препараты не достаточно дегидрированы до окрашивания или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты серией 1-минутных моек в EtOH (70%, 85%,100%). Высушите на воздухе и снова добавьте краситель.
	Неправильная концентрация красителя. ПРИМЕЧАНИЕ: краситель DAPI I в 8 раз более концентрированный, чем DAPI II.	Если окрашивание слишком яркое, разведите краситель в растворе (Список номер. 06J29-010) до использования.
	Краситель слишком старый или хранился на свету в течение продолжительного периода времени.	Храните краситель при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Cook JR. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol*. 2004;13(4):197-206.
2. 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. Available at: http:// www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/nhl.pdf. Accessed November 16, 2009.
3. Sun T, Nordberg ML, Cotelingam JD, et al. Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2003;74(1):78-84.
4. Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, et al. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2000;110(4):856-62.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. 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.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт компании http://www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI IGH/CCND1 DF FISH и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, 977, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом. Лицензированные американскими патентами 6, 414, 133 и 7, 250 и 254.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

2010, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608309/R5

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ETV6/RUNX1 DF FISH Probe Kit

en

REF 05N96-010

30-608485/R4

Vysis ETV6/RUNX1 DF FISH Probe Kit
REF 05N96-010
30-608485/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Биологический риск
	Опасность
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis ETV6/RUNX1 DF FISH Probe Kit предназначена для детекции транслокации t(12;21) (p13;q22) между генами ETV6 и RUNX1 используя методику флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

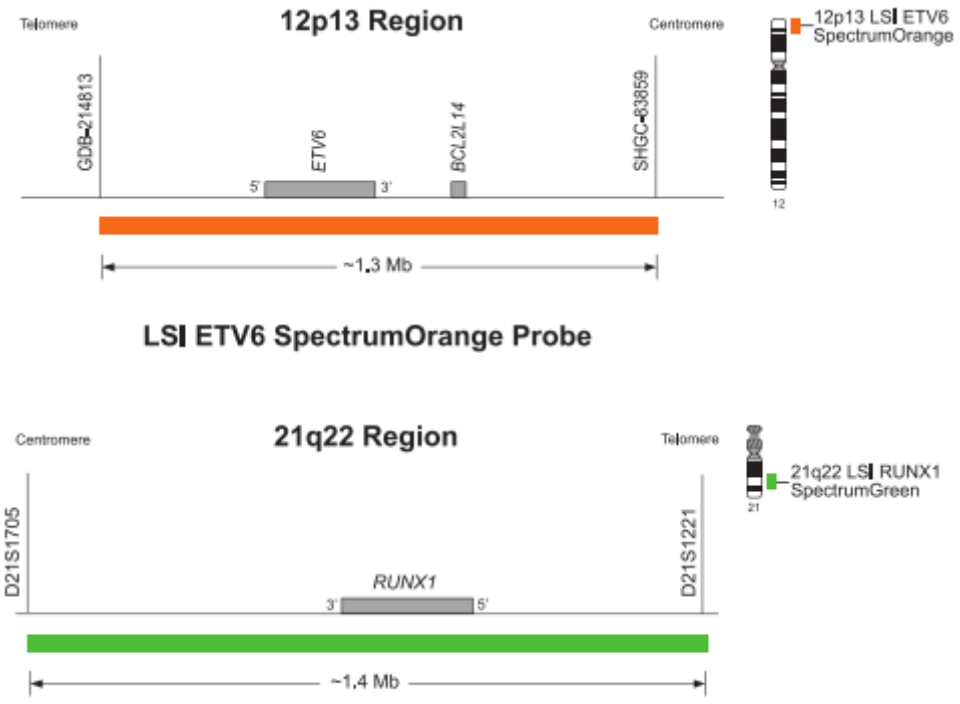
НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

t(12;21) (p13;q22) наиболее частая хромосомная абберация, встречающаяся при остром лимфобластном лейкозе у детей. Не детектируемые методами классической цитогенетики[1], транслокации t(12;21), возникающие в результате слияния 5' конца гена ETV6 на хромосоме 12p13 и почти полностью гена RUNX1, локализованного на хромосоме 21q22, встречаются в 25% случаев острого лимфобластного лейкоза[2]. Vysis ETV6/RUNX1 DF FISH Probe является двухцветной пробой, дизайн пробы предназначен для детекции транслокации t(12;21) методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером приблизительно 1,3 Mb **(**chr12:11321286-12578034 март 2006, УСК Геномный браузер) SpectrumOrange проба охватывает точку разрыва гена ETV6.
Размером приблизительно 1,4 Mb **(**chr12:11321286-12578034 март 2006, УСК Геномный браузер) SpectrumOrange (chr21:34452353-35813329 март 2006, УСК Геномный браузер) SpectrumGreen проба охватывает точку разрыва гена RUNX1.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

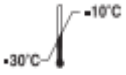


РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI ETV6/RUNX1 Dual Fusion FISH Probe 1 пробирка, 10 мкл на пробирку). 1,000 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).
2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30804824) (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH7,0).

Таблицы с Данными о Безопасности Материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Хранение



Vysis ETV6/RUNX1 Dual Fusion FISH Probe Kit необходимо хранить при температуре -20°C (±10°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis ETV6/RUNX1 Dual Fusion FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные илинаходящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI ETV6/RUNX1 Dual Color Dual Fusion Probes

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[4], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[5], CLSI документ M29-A3[6], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[7].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[4]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[7]

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

• Vysis ETV6/RUNX1 DF FISH Probe Kit предназначен для использования с образцами, которые были обработаны и хранятся в соответствии с инструкцией

•Не используйте Vysis ETV6 / / RUNX1 DF FISH Probe Kit по истечению срока годности

•Необходимо следовать инструкции. Несоблюдение инструкций может привести к ошибочным результататам.

Лабораторные меры предосторожности:

- Все биологические образцы должны рассматриваться как потенциально опасные из-за передачи инфекционных агентов. Поскольку существует возможность инфицирования, все образцы от человека должны обрабатываться с соблюдением универсальных мер предосторожности.
- Не подвергайте образцы взаимодействию с кислотами, сильными основаниями и действию высоких температур.
- Условия гибридизации могут негативно отображаться, если вы используете другие зонды, чем те, которые предлагает Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Флуорофоры очень чувствительны к действию света. Для ограничения распада все растворы и слайды, содержащие флуорофоры, ограничиваются пребыванием их на свету.
- Vysis ETV6 / RUNX1 DF FISH Probe Kit содержит формамид, тератоген.
- Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
- Всегда проверяйте температуру растворов для предварительной обработки и промывочных буферов перед каждым использованием путем измерения температуры с сосудах Коплина, используя калибровочные термометры.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с вашими руководствами по безопасной утилизации.

Необходимые материалы
• Vysis LSI ETV6/RUNX1 Dual Color Dual Fusion Probes
• Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Необходимые, но не поставляемые материалы
Лабораторные реагенты:
- Имерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре
- Очищенная вода
- Клей
- 12 N HCl
- 1 N NaOH
- DAPI II Counterstain/Antifade (List No. 06J50-001)
- 20X SSC (List No. 02J10-032)
- NP-40 (List No. 07J05-001

- **Лабораторное оборудование:**
- Чистые силанизированные или положительно заряженные предметные
- стекла
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1–10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймер
- Микроцентрифуга
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)
- Очищенная водяная баня (70°C to 80 C)
- Статичная водяная баня и водяная баня с циркуляцией (37єC)
- Стойкий к воздействию растворителей маркер (по желанию)
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Одноразовые наконечники (от 5 мл до 20 мл)
- Сосуды Коплина (12 Ч 50 мл рекомендуемый тип: вертикальный сосуд)
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендуемыми фильтрами
- Калибровочные термометры
- Магнитная мешалка
- pH метр
- Вортекс
- Фильтры 0,45 µm
- Инкубатор 37 °C
- Слайды (45 до 50 °C)
- ThermoBrite или эквивалент
- Карты влажности ThermoBrite

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH.

Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Гибридизация пробы SpectrumOrange к таргетному региону ДНК обозначается оранжевым сигналом флуоресценции. Гибридизация пробы SpectrumGreen к таргетному региону ДНК зеленым сигналом обозначается флуоресценции. Присутствие всех других участков ДНК будет флуоресцировать голубым сигналом как результат окрашивания контркрасителем DAPI II.

Процедура анализа

Соблюдайте меры предосторожности, указанные в упаковке перед взятием образцов для работы.

Приготовление растворов этанола (70%, 85%, и 100%).

Подготовить объем / объемы разведения 70% и 85% с использованием 100% этанола и очищенной воды. Хранить при комнатной температуре в плотно закрытом контейнере если не используете. Растворы могут быть использованы в течение 1 недели, если не происходит испарение или раствор не становится разбавленным или мутным из-за многократного использования.

20X SSC раствор

Смешайте 66 г 20X SSC и 200 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте.

Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI, если это необходимо.

Доведите объем до 250 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм.

Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев
или раньше при его помутнении или загрязнении.

0.4X SSC/0.3% NP-40 Wash Solution

Смешайте 20 мл 20X SSC и 950 мл очищенной воды. Добавьте 3 мл NP-40 пока NP-40 полностью не растворится. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью 1 N NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. .

Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC/0.1% NP-40 Wash Solution
Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH.
Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой в 0,45 мкм.
Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед началом **автоматической денатурации/гибридизации** процедуры до завершения шага 4 этого раздела, убедитесь, что материалы выдержали достаточно времени для разморозки.

1. Перенесите 20X SSC раствор в сосуды Коплина.
2. Перенесите 20X SSC из сосудов Коплина на водяную баню
приблизительно на 30 минут и перед использованием убедитесь, что раствор достиг температуры 37±1°C.
3. Определите, что температура 20X SSC достигла 37±1°C с помощью откалиброванных термометров.
4. Погрузите образцы слайдов в 20X SSC на 30 мин. при температуре 37±1°C.
5. Используя пинцет, достаньте слайды из 20X SSC, немедленно погрузите слайды в сосуд Коплина, содержащий 70% этанол минимум на 2 минуты и встряхните слайды в сосуде Коплина от 1 до 3 секунд. После 70% этанола перенесите слайды в 85% этанол минимум на 2 минуты и затем в 100% этанол минимум на 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ Погрузите не более 4 слайдов одновременно в каждый сосуд Коплина.

6. Высушите слайды.
7. После дегидратации в этаноле слайд может быть помещен в температуру 50°C на 2 минуты, чтобы полностью завершить сушку перед нанесением пробы.
ПРИМЕЧАНИЕ Держите образцы слайдов в 100% этаноле, пока не высушите все слайды и нанесите пробу зонда.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ/ГИБРИДИЗАЦИЯ ПРОБЫ
1. Достаньте ДНК-пробы, LSI/WCP Hybridization Buffer и очищенную воду из упаковки и дождитесь, пока реагенты достигнут комнатной температуры.
2. Отвортексируйте ДНК-пробы, LSI/WCP Hybridization Buffer в течении 2-3 секунд.
3. Центрифугируйте в течении 2-3 секунд.
4. Перенесите 7 мкл LSI/WCP Hybridization Buffer, 2 мкл очищенной воды, 1 мкл ДНК-пробы в 1,5 мл эппендорфы.
5. Отвортексируйте и отцентрифугируйте смесь еще раз тщательно.
6. Используя микропипетку добавьте 10 мкл смеси пробы на исследуемый образец и незамедлительно накройте покровным стеклом, избегая образования пузырей.
7. Заклейте покровное стекло, используя резиновый клей.
8. Перед добавлением образцов слайдов, вставьте карты влажности ThermoBrite в специальное углубление под крышкой системы ThermoBrite.
Позвольте закладкам внутри крышки поддерживать карты. Обратитесь к руководству по эксплуатации ThermoBrite относительно повторных карт
влажности при последующих запусках.
9. После того как карты влажности вставлены, насыщайте полоски дистилированной водой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Включите питание в системе ThermoBrite денатурации/гибридизации.

ПРИМЕЧАНИЕ

Включатель системы ThermoBrite расположен на задней панели. Прибор издаст звуковой сигнал, чтобы сообщить, что он включился. Главное меню будет отображаться, когда прибор наберет температуру 37 °C.

11. Установите на ThermoBrite программу, согласно следующим параметрам:

- Время денатурации: 2 минуты
- Температура денатурации: 73 °C
- Время гибридизации: 12 до 24 часов
- Температура гибридизации: 37 °C

12. После установления программы поместите образцы слайдов на прогретую поверхность 7,0±0,2. Аккуратно протолкните образцы к середине пластины, состыковав край слайда с маркированной позицией на панели слайдов.

ВНИМАНИЕ: Если происходит гибридизация менее чем 12 слайдов, используйте пустые слайды, чтобы общее количество слайдов было равно 12.

13. Закройте крышку ThermoBrite. Курсором нужно выделить линию PGM. Нажмите кнопку Enter для подтверждения.

ПРОЦЕДУРА ПРОМЫВКИ

1. Перенесите 70 мл **0.4X SSC/0.3% NP-40** и 70 мл **2X SSC/0.1% NP-40** в отдельные сосуды Коплина. Перенесите сосуды Коплина, содержащие **0.4X SSC/0.3% NP-40** на водяную баню приблизительно на 30 минут перед использованием. Доведите **2X SSC/0.1% NP-40** до комнатной температуры. Используйте приготовленный раствор только в течении одного дня и дальше утилизируйте.
2. Убедитесь, что температура **2X SSC/0.1% NP-40** 73±1°C, используя откалиброванные термометры.
3. Достаньте образцы слайдов из ThermoBrite.
4. Удалите покровное стекло с одного слайда и сразу же погрузите слайд в **0.4XSSC/0.3% NP-40.** Перемешайте слайд в сосуде Коплина в течении 1-3 секунды. Повторите процесс с другими слайдами до достижения количества 4 слайдов. Начните отсчет времени, когда будет опущен в раствор 4 слайд.

ВНИМАНИЕ: Для поддержания нужной температуры в **0.4X SSC/0.3% NP40** необходимо промывать 4 слайда одновременно. Если у вас менее 4 слайдов, добавьте пустые слайды, чтобы общее количество стало 4.

5. Удалите слайды после 2 минут±30 секунд.
6. Погрузите слайды в сосуды Коплина, содержащие **0.4X SSC/0.3% NP-40.** Перемешайте слайды в сосуде Коплина в течении 3-5 секунд.
7. Удалите слайды из **0.4X SSC/0.3% NP-40** где они были погружены от 5 до 60 секунд.

ВНИМАНИЕ: Для промывки дополнительных слайдов, убедитесь, что температура промывочногораствора 73±1 °C.

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

1. Высушите каждый слайд коснувшись нижнего края слайда на бумажном полотенце и вытрите нижнюю сторону слайда, ту сторону, которая не содержит образец, высушите на бумажном полотенце.
2. Высушите слайды в темноте на длинной стороне слайда для ускорения испарения и прекратите взаимодействие с **2X SSC/0.1% NP-40** максимум на 2 часа.
3. Достаньте конткраситель DAPI II из упаковки и дождитесь, пока реагент достигнет комнатной температуры.
4. Отвортексируйте DAPI II в течении 2-3 секунд.
5. Отцентрифугируйте конткраситель DAPI II 2-3 секунды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Используя пипетку, добавьте 10 мкл контркрасителя DAPI II к каждому таргетному образцу на слайде и накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для каждого слайда.
7. Подождите минимум 10 минут до начала работы на микроскопе.

Процедура архивации
Храните слайды после гибридизации при температуре -20 °C избегая попадания света. В таких условиях слайды могут храниться вместе с осушителем в течении 3 недель после нанесения контркрасителя DAPI II без существенной потери интенсивности сигнала.

Исследование слайдов
Просмотр слайдов производится с учетом использования подходящего фильтра на флуоресцентном микроскопе. Следующие наборы оптических фильтров используются при визуализации флуорофоров при гибридизации.

Использование фильтров Vysis	Одновременное возбуждение и эмиссия
Одиночный зеленый SpectrumGreen флуорохром	Одиночный зеленый SpectrumGreen флуорохром
Одиночный оранжевый SpectrumOrange флуорохром	Одиночный оранжевый SpectrumOrange флуорохром
Двойной оранжевый/зеленый SpectrumOrange и SpectrumGreen	Двойной оранжевый/зеленый SpectrumOrange и SpectrumGreen
Тройной – DAPI, Green, Orange	DAPI, SpectrumGreen, SpectrumOrange флуорохромы

Фильтры, оптически эквивалентные фильтрам Vysis, также могут использоваться. Например, Chroma® 82000, используется с фильтрами82102 это эквивалент Vysis Orange/Green v2 фильтра.

Интерпритация результатов
Контроль качества
Оценка достаточности слайда
Оценка адекватности слайда используется по следующим критериям. Если критерии не встречаются, образцы слайдов не должны оцениваться.
Ядерная морфология: Границы ядер должны быть хорошо различимы и не повреждены.
Общая информация: Фон, который возникает, должен быть темный или черный и относительно свободный от люминисцентных частиц и помутнения.
Интенсивность сигнала пробы: Сигнал должен быть ярким, компактным, округлой или овальной формы, отличимым и легко оцениваемым.

Подсчет сигналов:
Используя необходимые фильтры, перечисленные выше, две технологии, каждая для подсчета ядер с сигналами паттернов на каждые сто ядер.
Первый исследователь оценивает ядра на левой стороне гибридизационной мишени (которая определяется лучше), второй исследователь оценивает ядра на правой стороне гибридизационной мишени (которая определяется лучше). Обратитесь к таблице 1 для подсчета сигналов.

- Выберите только неповрежденные ядра, которые не свернуты, не перекрыты и не завалены омертвевшими клетками.
- Избегайте подсчета слайдов или площадей внутри слайдов, которые имеют чрезмерно неспецифическую гибридизацию или много ядер, которые имеют чрезмерно много или чрезмерно мало сигналов.
- Избегайте подсчета ядер со сгустками или облаками сигналов.
- Сигналы одинакового цвета могут не быть одной интенсивности в данном ядре. Таким образом, возникает необходимость использовать соответствующий одиночный фильтр и/или приспособить фокальную плоскость.
- Сигналы одного цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом.
- Если это небольшие нити сигналов, соединяющих разделенные сигналы, они также подсчитываются как один сигнал.

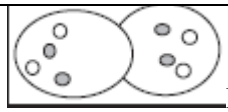
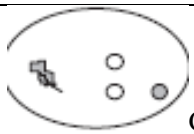
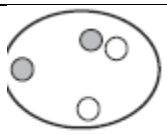
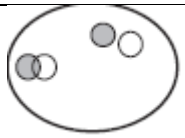
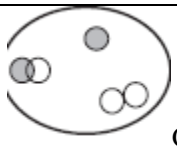
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Оранжевые или зеленые пары сигналов с наложением или с зазором менее чем один сигнал считаются как слитные.
- Если образец имеет низкий уровень абнормальных FISH паттернов, используется соответствующий фильтр пропускания для подтверждения паттернов, которые рекомендованы.
- Несоблюдение этих рекомендаций может привести к неточности при идентификации сигналов.
- Если есть какие-то сомнения относительно того, должны ли быть подсчитаны клетки или нет, не подсчитывайте клетки.

Таблица 1 Подсчет двойных сигналов

○ Зеленый сигнал

● Оранжевый сигнал

1.	 Если ядра перекрываются, не подсчитывать
2.	 Считать как два оранжевых и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал слитный
3.	 Считать как один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Оранжевый/зеленый пары сигналов с наложением или зазаром менее чем один оранжевый или один зеленый сигналы подсчитываются как слитный. Верхняя пара сливается, нижняя нет
4.	 Считается как два слитных сигнала. Верхние пары оранжевого/зеленого сигналов имеют зазор менее одного сигнала. Пары верхних сигналов перекрываются.
5.	 Считается как один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Зеленый сигнал разделяется.

Ограничение в использовании

Интерпретация результатов FISH-исследования должна проходить с помощью соответствующих контрольных и аналитических методов, а также принимая во внимание другие клинические и диагностические исследования. Индивидуальные лаборатории должны установить аналитически нормальную отсечку для каждого интересующего абнормального сигнала паттернов.

Ограничение процедуры

The Vysis ETV6/RUNX1 DF FISH Probe Kit предназначена для использования в комбинации с дополнительными биомаркерами, морфологией и другой дополнительной информацией.
Если образцы имеют низкий уровень абнормальных паттернов FISH, используйте соответствующий одиночный фильтр для подтверждения паттернов, как это рекомендовано. Несоблюдение рекомендаций может привести к неточной идентификации сигналов.

Ожидаемые результаты

Ожидаемые нормальные сигналы паттернов Vysis ETV6/RUNX1 DF FISH Probes это два оранжевых и два зеленых сигнала. Так же как и транслокация (t 12;21) может сопровождаться аберрациями,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

включающими потерю нетранслокационного региона ETV6, могут возникать несколько отличных анормальных сигналов паттернов. Они включают один оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала; ноль оранжевых, один зеленый и два слитных; один оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала. Могут также возникать другие абнормальные сигналы паттернов. Метафазный анализ мог бы помочь в характеристике некоторых абнормальных сигналов паттернов.

Особые характеристики

Аналитическая метафазная чувствительность и специфичность

Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов, которые гибридизуются в правильном локусе, а не в каком-либо другом локусе. Аналитическая чувствительность определяется как процент хромосомных мишеней с ожидаемыми сигналами паттернов.

Аналитическая специфичность Vysis LSI ETV6 SpectrumOrange/RUNX1 SpectrumGreen проба для соответствующих таргетных локусов на хромосоме была опубликована, используя метафазные хромосомы, подготовленные из культуры периферической крови пяти кариотипически нормальных образцов слайдов. Локализация гибридизации каждого FISH сигнала на хромосоме от 20 последовательных метафазных ядер на каждом из пяти слайдов оценено в общей сложности 200 таргентных локусов. Для каждой пробы и образца было подсчитано количество FISH сигналов на метафазных хромосомах гибридизуемых с правильным локусом и число FISH сигналов на метафазных хромосомах, гибридизуемых с неправильным локусом. Специфичность каждой пробы была рассчитана как число FISH сигналов на метафазных хромосомах гибридизуемых с правильным локусом, поделенное на общее количество гибридизуемых FISH сигналов на метафазных хромосомах и умноженное на 100 для получения процента. Аналитическая специфичность Vysis LSI ETV6 SpectrumOrange/RUNX1 SpectrumGreen была 100%, как показано в таблице 2. Чувствительность каждой пробы была подсчитана как количество гибридизуемых FISH сигналов метафазных хромосом с правильным локусом, разделенное на 200 таргетных локусов и умноженное на 100 для получения процента. Аналитическая чувствительность Vysis LSI ETV6 SpectrumOrange/RUNX1 SpectrumGreen была 100%, как показано в таблице 2.

Табл. 2 Метафазная аналитическая чувствительность и специфичность

Проба	Правильная цитогенетическая мишень	Ожидаемое	Гибридизуемое с правильным локусом-мишенью	Гибридизуемое с неправильным локусом-мишенью	Чувствительность	Специфичность
ETV6	12p13	200	200	0	100	100
RUNX1	21q22	200	200	0	100	100

Представление

Производительность была оценена путем тестирования трех нормальных образцов пациента (от пациентов, у которых нет t (12;21) (p13;q22)) и трех абнормальных образцов пациента (образцы от пациента на момент постановки диагноза или получающим лечение от какого-либо заболевания и содержащем t (12;21) (p13;q22) транслокации между генами ETV6 и RUNX1).

Слайды (два на образец) были получены от пациентов с уже заранее известными нормальными или абнормальными как результат транслокации t (12;21) (p13;q22) с последующей гибридизацией. Сигналы паттернов были подсчитаны для каждого образца и слайда. Каждый слайд был оценен двумя исследователями, каждый считал 100 ядер, в результате было подсчитано 200 ядер.

В таблице 3 показан диапазон от низкого количества до высокого количества на 200 ядер для каждого паттерна, указанного в таблице (не включая все видимые паттерны)*.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Табл. 3 Соблюдаемый диапазон подсчетов (на 200 ядер)

Сигнал	2R2G	1R1G2F	2G2F	1R2G2F	1R2G1F	2R2G1F
Нормальный #1	182-195 -	0	0	0	1	0
Нормальный#2	182-195 -	0	0	0	0	0
Нормальный#3	182-195 -	0	0	0	0	0
Абнормальный #1	0-3	1-4	4	0-2	77-89	2-8
Абнормальный#2	13	126	28	1	1	1
Абнормальный#3	8-10	17-36	0	0-11	6-14	73-109

*Представительные данные; результаты в разных лабораториях могут варьировать от этих данных.
** Один слайд исключает менее чем 200 пронумерованных ядер.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, et al. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1995;86(11):4263-4269.
2. Harrison CJ, Haas O, Harbott J, et al. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Munster study group. *Br J Haematol.* 1995;151(2):132-142.
3. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.
4. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
5. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
7. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
8. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Адрес Полномочного Представителя (AR) ABBOTT Max-Planck-Ring 2
65205 Вейсбаден
Германия
Телефон: +49-6122-580

Vysis ETV6/RUNX1 разрешены на основании европейского патента 5, 663, 319, и 5, 491, 224 приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, и 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы обнаружения генетических транслокаций защищены патентом США 6, 280, 929 и лицензированы исключительно для Abbott Mol. Методы окраски 21 хромосомы защищены американскими патентами 6, 500, 612, приписанного [2] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2011, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608485/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit

en

REF 05N54-020

30-608292/R3

Vysis BCR/ABL1/ASS1
Tri-Color DF FISH Probe Kit
REF 05N54-020
30-608292/R3

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-10°C -30°C	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

ДНК-зонд Vysis BCR/ABL1/ASS1 трехцветный с двойным соединением (трехцветный ДНК-зонд) предназначен для детекции перестроек регионов 9q34 (LSI ASSABL), 22q11.2 (LSI BCR) с помощью флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Транслокация t (9;22) в результате слияния генов BCR на хромосоме 22q11.2 и гена ABL1 на хромосоме 9q34 детектируется цитогенетическими методами у более чем 80% пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ)[1]. В случаях ХМЛ при отсутствии возможности детектировать транслокацию цитогенетическими методами, слияние генов BCR/ABL1 почти всегда может быть обнаружено методом FISH и другими молекулярными методами. Слияние генов BCR/ABL1 также встречается в части случаев острого лимфолейкоза и реже острого миелоидного лейкоза[2].

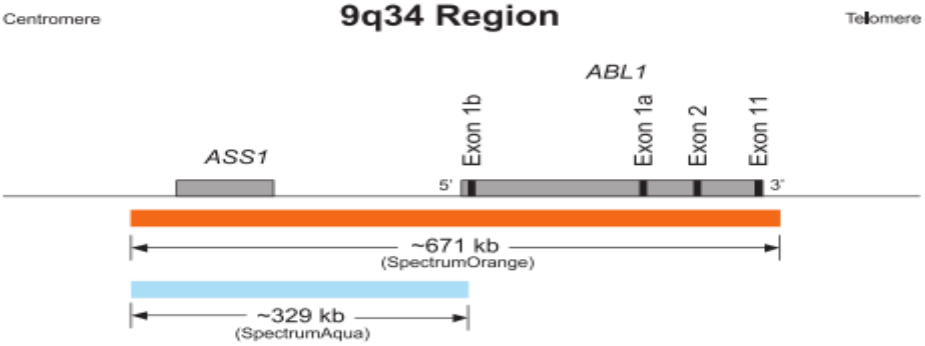
Примерно от 15 до 20% случаев ХМЛ, транслокация t (9;22) приводит к потере генетического материала, фланкирующего точки разрыва BCR и ABL1 на хромосоме 9[1,3]. Эта потеря может предотвратить производство высокоспецифичных сигналов двойного слияния, ожидаемых от двухцветных проб и сбалансированных транслокаций. Если оба целевых гена BCR и ABL1 удаляются с 9 хромосомы, низкоуровневое случайное перекрытие оранжевых и зеленых сигналов в нормальных клетках (производят один зеленый сигнал, один оранжевый и один слитный сигналы) нельзя отличить от низкоуровневого истинного слияния генов BCR/ABL1, производящие тот же паттерн сигналов. Трехцветный дизайн данной пробы - в данной пробе используется зонд третьего

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

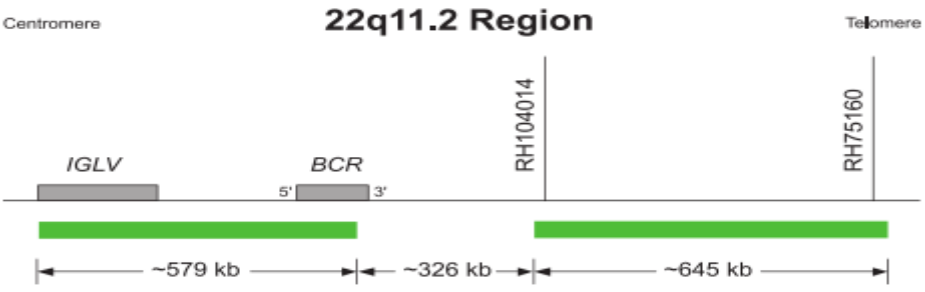
цвета (голубой) на центромерной стороне точки разрыва гена ABL1, который совмещен с оранжевым сигналом в случайном слиянии сигналов оранжевый/зеленый, но отсутствует в истинном слиянии генов BCR/ABL1 на хромосоме 22.
Зонды из данного набора использовались в опубликованных статьях для обнаружения низких уровней положительных клеток у пациентов с ХМЛ, которые проходили терапию и у которых была детектирована делеция сигналов FISH на хромосоме 9[1,3].

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

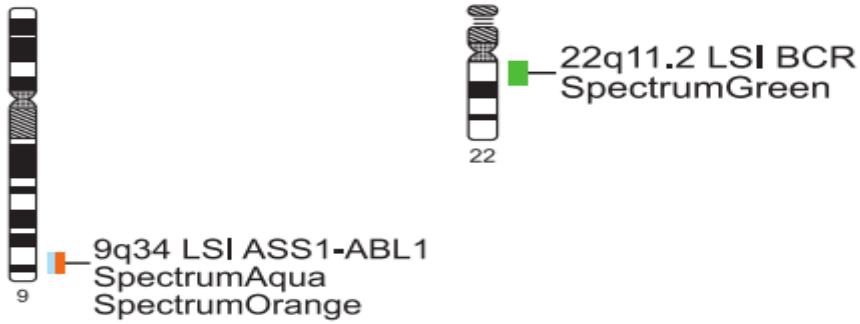
Размером приблизительно 671 Kb (chr9:132255025-132926107; Март 2006, UCSC, Геномный браузер)[4] SpectrumOrange LSI ABL1 зонд охватывает гены ABL1 и ASS1 на хромосоме 9q34. Размером приблизительно 329 Kb (chr9:132255025-132584487; Март 2006, UCSC, Геномный браузер)[4] SpectrumAqua LSI ASS перекрывает область, охватываемую зондом SpectrumOrange, захватывает ген ASS1 и лежит центромерно по отношению к точке разрыва региона гена ABL1.
Зонд SpectrumGreen LSI BCR проба состоит из двух зондов, локализованных на хромосоме 22q11.2. Центромерный сегмент пробы SpectrumGreen размером приблизительно 579 Kb (chr22:21382633-21962088; Март 2006)[4] и содержит большую часть гена BCR. Теломерный сегмент пробы SpectrumGreen размером приблизительно 645 Kb (chr22:22288218-22932815; Март 2006)[4] и лежит теломерно к точке разрыва региона гена BCR. Разрыв приблизительно 326 Kb между двумя пробами, меченными зеленым флуорохромом.



LSI ASS1-ABL1 Dual Fusion Probe



LSI BCR SpectrumGreen Dual Fusion Probe



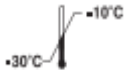
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 трехцветная проба (номер партии 30-231046) (1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 1062.5 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826) (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0). Таблицы с Данными о Безопасности Материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Хранение



Vysis **LSI BCR/ABL1/ASS1 трехцветная пробу** необходимо хранить при температуре -20°C (±10°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда **Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit** осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[4]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[7]

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура

Необходимые материалы (в комплекте)
- Vysis LSI BCR/ABL1/ASS Tri-Color Dual Fusion Probes
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид ультравысокой очистки
- Контрастирующий краситель DAPI II
- Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.
Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.
Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[5].

Ожидаемые результаты

Ожидаемый нормальный паттерн сигналов для зонда Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit это два оранжевых, два голубых и два зеленых сигнала. Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для зонда Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit будет зависеть от деляционного статуса таргетной пробы, фланкирующей точки разрыва, являющиеся результатом производной 9 хромосомы.

- В сбалансированной транслокации t(9;22) без делеции таргетного региона на хромосоме 9, ожидаемые сигналы паттернов, это один оранжевый, один зеленый и один слитный сигналы. Один оранжевый сигнал, и один из двух слитных сигналов, будут иметь связанные голубые сигналы.
- Если таргетный регион гена ABL1 на хромосоме 9 потерян, ожидается один оранжевый, два зеленых и один слитный паттерн сигналов. Оранжевый сигнал будет иметь связанные голубые сигналы.
- Если таргетный регион гена BCR на хромоосме 9 отсуствует, ожидаемые сигналы это два оранжевых, один зеленый и один слитный сигналы. Оба оранжевых сигнала на нормальной 9 хромосоме и der хромосомы 9, отмечается связанный с ними голубой сигнал.
- Если оба таргетных гена ABL1 и BCR выпадают на der хромосоме 9, ожидается один оранжевый, один зеленый и один слитный сигналы. Опять же, один оранжевый сигнал (нормальная хромосома 9) будет иметь связанный голубой сигнал.

Во всех случаях истинный сигнал слияния генов BCR/ABL1 не будет иметь ассоциированного голубого сигнала, поскольку голубая проба лежит центромерно к точке разрыва гена ABL1 и таким образом не учувствует в слиянии онкогенных генов. Этот факт является основой для истинного отличия молекулярного слияния 5' BCR/ABL1 от другого слияния оранжевого и зеленого сигналов или они являются результатом der 9 или случайного перекрытия нормальных сигналов хромосом. Могут встречаться другие атипичные сигналы паттернов и метафазный анализ может быть полезен в характеристике таких паттернов. В публикациях Smoley et al[1] и Sui et al[3] использовали пробы, содержащиеся в этом наборе и продемонстрировали паттерны сигналов, наблюдаемые у пациентов с делециями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ограничения процедуры

Для интерфазного анализа, индивидуальные лаборатории должны публиковать аналитически нормальный cut-off для атипичных паттернов сигналов и использованием соответствующих технологий, описанных Wiktor et al[5].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	FISH или фильтры микроскопа повреждены.	
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Smoley SA, Brockman SR, Paternoster SF, et al. A novel tricolor, dual-fusion fluorescence in situ hybridization method to detect BCR/ABL fusion in cells with t(9;22)(q34;q11.2) associated with deletionof DNA on the derivative chromosome 9 in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;148(1):1-6.

2. Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(FISH) in BCR/ABL leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia.* 2003;17(6):1124-9
3. Siu L, Ma E, Wong WS, et al. Application of tri-colour, dual fusion fluorescence in situ hybridization (FISH) system for the characterization of BCR-ABL1 fusion in chronic myelogenous leukaemia (CML) and residual disease monitoring. *BMC Blood Disord.* 2009;9:4.
4. Ken t WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
5. Wikt or 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
8. 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.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Адрес уполномоченного представителя
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
Телефон: +49-6122-580
E-mail: help@abbottmolecular.com

Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color Dual Fusion Probes защищены европейскими патентами EP 0 549 709 B1, приписанными Abbott Molecular.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abott. Все права защищены.
www. abbottmolecular. Com
Июль 2020
30-608292/R6

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IGH/MAF DF FISH Probe Kit

en

REF 05N32-020

30-608270/R4

Vysis IGH/MAF DF FISH Probe Kit
REF 05N32-020
30-608270/R4
Изменения выделены

ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±5°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗВАНИЕ

Vysis IGH/MAF DF FISH Probe Kit

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis IGH/MAF FISH Probe Kit проба предназначена для обнаружения рицепрокных транслокаций t (14;16) (q32; q23), включающих регионы генов IGH и MAF.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

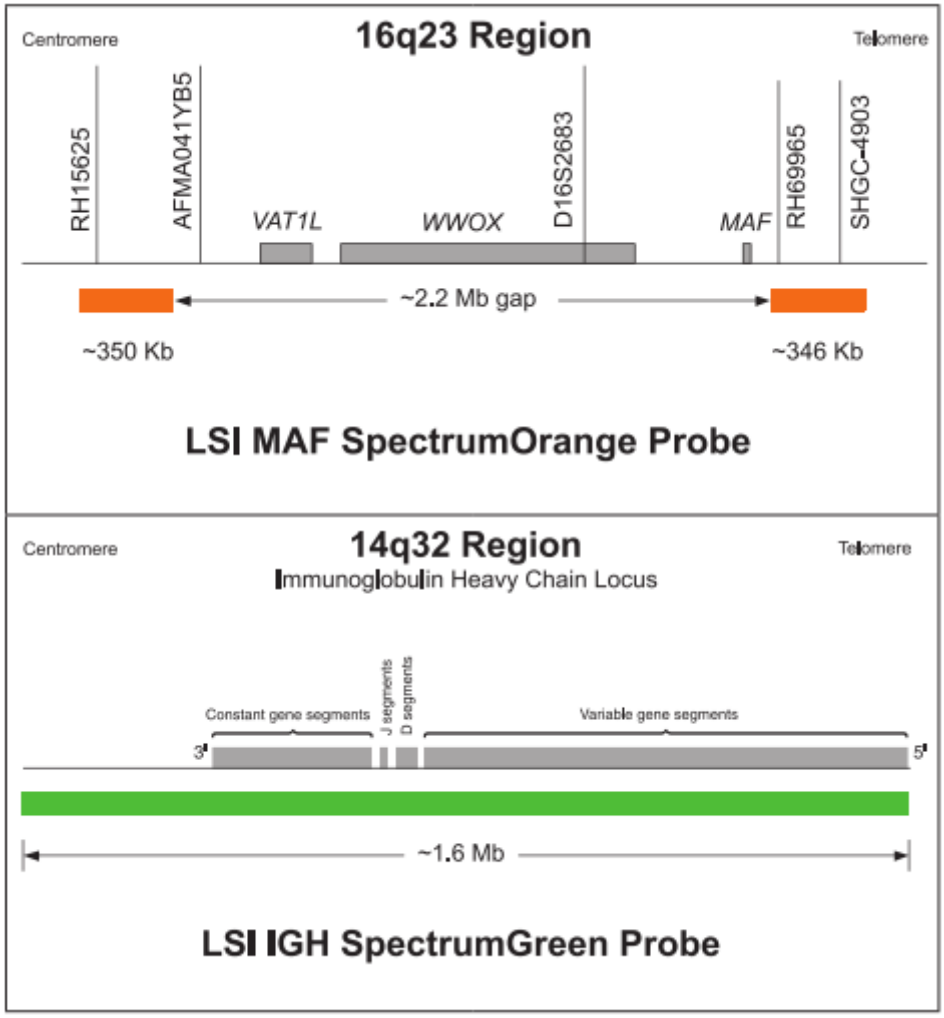
MAF является онкогеном, который, как было обнаружено, экспрессируется при множественной миеломе (ММ).[1] Недавние исследования проанализировали эффект делеции (16q), возможно из-за потери гена WWOX, по прогнозу при впервые диагностированной ММ и обнаружили связь с худшей общей выживаемостью.

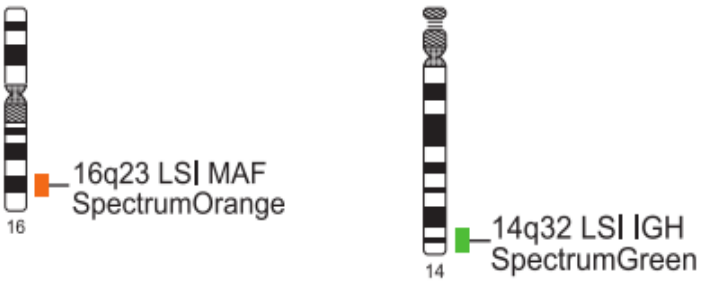
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Оба гена MAF и WWOX находятся в тандеме на хромосоме 16q23. Транслокация t(14;16) (q32; q23) ассоциирована с более агрессивными формами ММ.[3] Т.о. FISH-тестирование для определения транслокаций t(14;16) (q32; q23) указывается как один из минимальных клинических тестов для диагностики ММ и определения тактики лечения.[4,5]

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Зонд SpectrumOrange фланкирует регион гена MAF и состоит их двух сегментов, каждый примерно 350 кб с разрывом приблизительно 2.2 Мб. Центромерный сегмент локализован на хромосоме 16:75729985-76079705 (Март 2006, Геномный браузер) и теломерный сегмент, локализован на хромосоме 16:78290003-78635873 (Март 2006, Геномный браузер). Размером приблизительно 1,6 Мб зонд SpectrumGreen охватывает IGH регион. (chr14: 104736507-106339460, Март 2006).



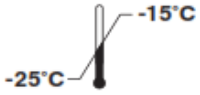


Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

1. Зонд Vysis LSI IGH/MAF Dual Color Dual Fusion (DCDF) Probes (серия № 30-231014)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 1300 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Зонд Vysis IGH/MAF DF FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Условия транспортировки
Транспортировка зонда Vysis IGH/MAF DF FISH Probe Kit методики (набор реактивов) осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**
Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis LSI IGH/MAF DF Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[7]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[10]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор

Смешайте 100 мл 20XSSC (pH5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)

Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)

Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC/0,3% NP-40 раствор для быстрой отмывки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC, в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу

Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика

Необходимые материалы

- Зонды Vysis LSI IGH/MAF Dual Color Fusion (DCDF) Probes
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.
   ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºС.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°С для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°С на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºС минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºС.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Ожидаемые результаты

Ожидаемый нормальный паттерн сигналов зонда Vysis IGH/MAF DF FISH Probe это два оранжевых и два зеленых сигнала. Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для зонда Vysis IGH/MAF DF FISH Probe это один оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала. Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4XSSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте время гибридизации. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2XSSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2XSSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2XSSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что значения pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многополосные фильтры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза) (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Обрабатывайте такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые температуру и временные промежутки в соответствии с методикой анализа из данной инструкции.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи герметика, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH–метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многопропускные фильтры дают меньше света, чем однопропускные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многопропускных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		свяжитесь с технической службой Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Chesi M, Bersagel PL, Shonukan OO, et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an lg locus in multiple myeloma. *Blood*. 1998;91(12):4457-63.
2. Jenner MW, Leone PE, Walker BA, et al. Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3291-300.
3. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003;101(11):4569-75.
4. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-21.
5. Anderson KC, Alsina M, Bensinger W, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: multiple myeloma. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009;7(9):908-42.
6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*.
CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI IGH/MAF FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, 977, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все остальные торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020 г.
30-608270/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis SRY/CEP X FISH Probe Kit

en

REF 06N29-020

30-608911/R4

Vysis SRY/CEP X
FISH Probe Kit
REF 06N29-020

30-608911/R4
Изменения выделены
Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор зондов Vysis SRY/CEP X Probe Kit предназначен для обнаружения перемещения области гена SRY от нормального положения на Y хромосому с использованием технологии флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Определение пола у людей зависит от наличия гена SRY. Позиционные аномалии с вовлечением региона гена SRY, обычно расположенной на хромосоме Yp11.3 описаны в литературе и включают транслокацию к X хромосоме или аутосоме.[2-4] Эти перемещения региона гена SRY могут приводить к несоответствию полового фенотипа и ожидаемого цитогенетического генотипа.

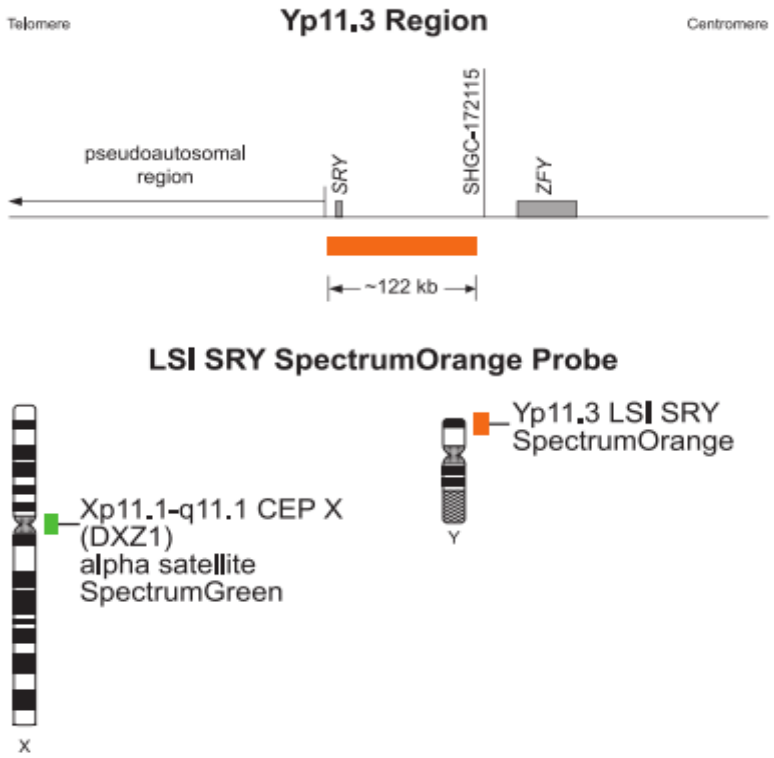
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Зонд Vysis LSI SRY/CEP X использовали для идентификации позиционных аномалий в регионе гена SRY в клинических исследованиях.[2-4]

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Зонд SpectrumGreen содержит альфасателлитные последовательности DXZ1 и специфичен для хромосомы Xp11.1-q11.1.

Зонд SpectrumOrange размером приблизительно 122 кб (chrY: 27073602829346, Март 2006) охватывает регион гена SRY.



РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI SRY SpectrumOrange/CEP X SpecrtumGreen Probes (Номер партии 30-191007)

(1 флакон, 10 мкл/флакон). 212.5 нг/мкл, меченая флуорохромом ДНК-проба и блокирующая ДНК в ТРрис-ЭДТА.

2. Vysis LSI/WCP Гибридизационный буфер (Номер партии 30-804824)

(1 флакон, 150 мкл на флакон). Сульфат декстарана, формамид, SSC (pH 7.0).

Таблицы с данными о безопасности материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Vysis LSI SRY/CEP X FISH Probe Kit должны храниться при -20°C (±10°C) в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТРОВКИ

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis SRY/CEPX FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI SRY SpectrumOrange /CEP X SpecrtumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[10]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки:
• Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света.
Разрушение: под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Залитые в формалин, заключенные в парафин образцы опухолевой ткани помещались на слайды с использованием стандартных цитогенетических процедур.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI SRY SpectrumOrange CEP X SpectrumGreen Probes
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP®

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Приготовление целевого образца
ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.
1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погружайте не более, чем 4 препарата одновременно.
3. Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

Приготовление пробной смеси
1. Добавьте следующие ингредиенты для каждой целевой области, в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.
2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73±1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.
1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов. Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Методика быстрой помывки
ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2XSSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:
- Налейте 70 мл 0.4XSSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.

- Налейте 70 мл 2XSSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.
1. Удалите покровное стекло одного препарата и немедленно погрузите препарат в 0.4X SSC/0.3% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Повторите эту манипуляцию с каждым препаратом.
2. Удалите препараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температуре отмывочного раствора составляет 73±1°C до помывки других препаратов.
3. Погрузите препараты в 2XSSC/0.1% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Удалите препараты через 5 секунд - 1 минуту.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: Препараты, которые хранятся при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте могут быть проанализированы в течение, по крайней мере, 3 недель после гибридизации.

Использование коденатурации
Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения препаратов образцов с пробами и покровными стеклами, на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, препараты удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Опис
анные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
2 мкл очищенной H_2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H_2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite™. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite™ может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа-или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл красителя в целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Ожидаемый нормальный паттерн метафазного сигнала для мужских образцов с кариотипом 46, XY для зонда Vysis LSI SRY SpectumOrange/CEP X SpectrumGreen Probes это один оранжевый сигнал на Y хромосоме и один зеленый сигнал на X хромосоме. Сигнальный паттерн одного зеленого сигнала на каждой X хромосоме при отсутствии оранжевого сигнала ожидается в нормальных женских образцах с кариотипом 46, XX. Ожидаемые атипичные метафазные паттерны для образцов без Y хромосомы и в которой произошли транслокации региона SRY это один оранжевый (на X хромосоме или аутосоме) и один зеленый сигнал на каждой X хромосоме. Могут встречаться и другие атипичные паттерны сигналов.

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[6].

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Sekido R and Lovell-Badge R. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends in Genetics.* 2009:25(1):19-29.
2. Chernykh VB, Vyatkina SV, Antonenko VG, et al. Unique mosaic X/Y translocation/insertion in infant 45, X male. *Am J Med Genet A.* 2008:146A(24):3195-7.
3. Dauwerse JG, Hansson K, Brouwers AAM, et al. An XX male with the sex-determining region Y gene inserted in the long arm of
chromosome 16. *Fertility and Sterility.* 2006:86(2):463.e1-463.e5
4. Minor A, Mohammed F, Farouk A, et al., Genetic characterization of two 46, XX males without gonadal ambiguities. *J Assist Repro*
Genetics. 2008:25:547-522
5. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.
6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009.
[Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
10. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI SRY SpectrumOrange /CEP X SpecrtumGreen Probes защищены Европейскими патентами EP 0 549 709 B1 и дающего Abbott Molecular эксклюзивное право.
CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.
Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2010, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608911/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis Williams Region Probe ELN/ D7S486, D7S522 FISH Probe Kit en

REF 06N28-020

30-608912/R4

Vysis Williams Region Probe ELN/ D7S486, D7S522 FISH Probe Kit

REF 06N28-020

30-608912/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis Williams Region Probe ELN/D7S486, D7S522 FISH Probe Kit предназначена для детекции делеций, включающих регион гена Williams (ELN) на хромосоме 7q11.23 с использованием технологии флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

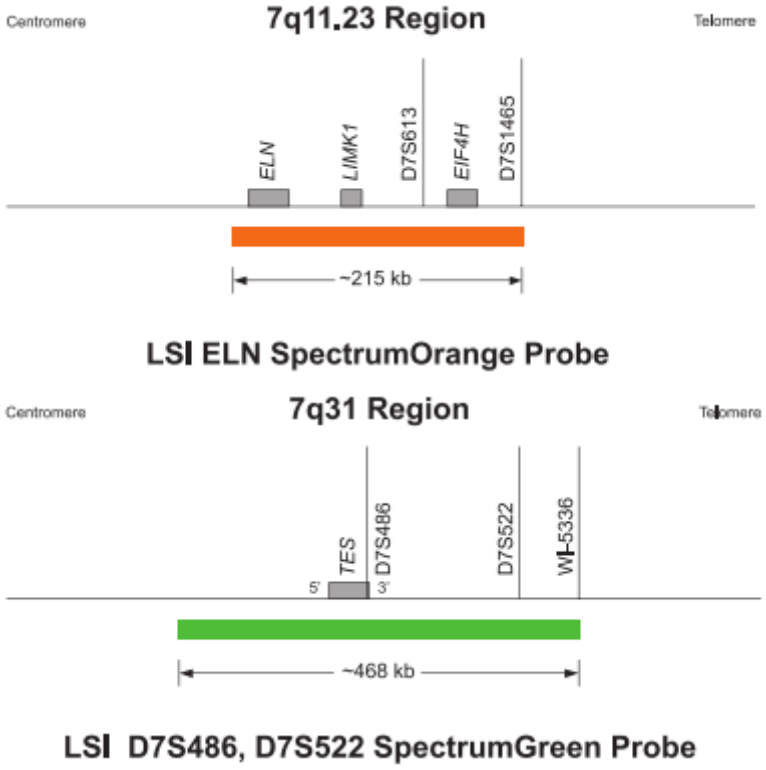
Синдром Вильямса-Берена – это нарушение в развитии, обычно происходит из-за делеции, размером 1,5 мегабаз на хромосоме 7q11.23, которая включает ген эластин (ELN).[1,2] Зонд Vysis Williams Region Probe ELN/D7S486, D7S522 FISH Kit использовались в опубликованных статьях для обнаружения делеций в гене ELN.[1,2]

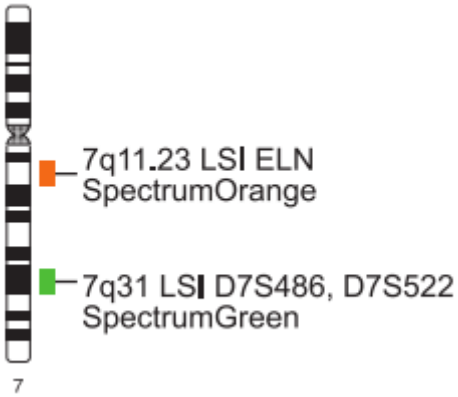
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером приблизительно 215 кб (chr:7:73066773-73281620; Март 2006)[3] SpectrumOrange Probe содержит полностью ген ELN и локализована в регионе хромосомы 7q11.23.

Размером приблизительно 468 кб (chr:7:115462602-115930526; Март 2006)[3] SpectrumGreen Probe локализована в регионе хромосомы 7q31.2.





Реагенты

1. Зонд Vysis LSI ELN SpectrumOrange /D7S486, D7S522 SpectrumGreen Probes (серия № 30-190041)

(1 флакон, 20 мкл/флакон). 400 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804824)**

(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Таблицы с данными о безопасности материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ

Vysis Williams Region Probe ELN/D7S486, D7S522 FISH Probe Kit хранится при температуре -20°C (±10°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis Williams Region Probe Region Probe ELN/D7S486, D7S522 FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI ELN SpectrumOrange /D7S486, D7S522 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки:

• Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ВНИМАНИЕ: Только для профессионального использования. Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор

Смешайте 100 мл 20XSSC (pH5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)

Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)

Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC/0,3% NP-40 раствор для быстрой отмывки

Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC, в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу

Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика

Необходимые материалы

- Зонды Vysis LSI ELN/D7S486, D7S522 FISH Probe Kit
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.

Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.

Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

температурой 73±1ºС приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºС. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºС приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºС) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºС.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°С для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°С на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Ннн Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Методики контроля качества
С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Ожидаемые результаты
Ожидаемые нормальные паттерны сигналов для зонда Williams Region Probe ELN/D7S486, D7S522 FISH Probe Kit это два оранжевых и два зеленых сигнала.
Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для зонда Williams Region Probe ELN/D7S486, D7S522 FISH Probe Kit это один оранжевый и два зеленых сигнала. Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Ограничения при использовании
Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[4].

Ошибочные результаты коденатурации
Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ:

1. De Souza DH, Morreti-Ferriera D, De Souza Rugolo LMS. Fluorescent in situ hybridization (FISH) as a diagnostic tool for Williams-Beuren syndrome. *Genet Mol Biol.* 2007:30:17-20.
2. Sugayama SMM, Moises RL, Wagenfur J, et al. Williams-Beuren Syndrome. Cardiovascular abnormalities in 20 patients diagnosed with fluorescence in situ hybridization. *Arq Bras Cardiol.* 2003:81:468-473.
3. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.
4. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka 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. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
6. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
8. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI ELN SpectrumOrange /D7S486, D7S522 SpectrumGreen Probes защищены Европейскими патентами EP 0 549 709 B1 и дающего Abbott Molecular эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2010, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608912/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis CBFB Break Apart FISH Probe Kit

en

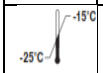
REF 05N44-020

30-608282/R4

Vysis CBFB Break Apart
FISH Probe Kit
REF 05N44-020
30-608282/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis LSI CBFB Dual Color Break Apart Rearrangement проба для флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) предназначена для детекции хромосомных перестроек в гене CBFB на хромосоме 16q22.

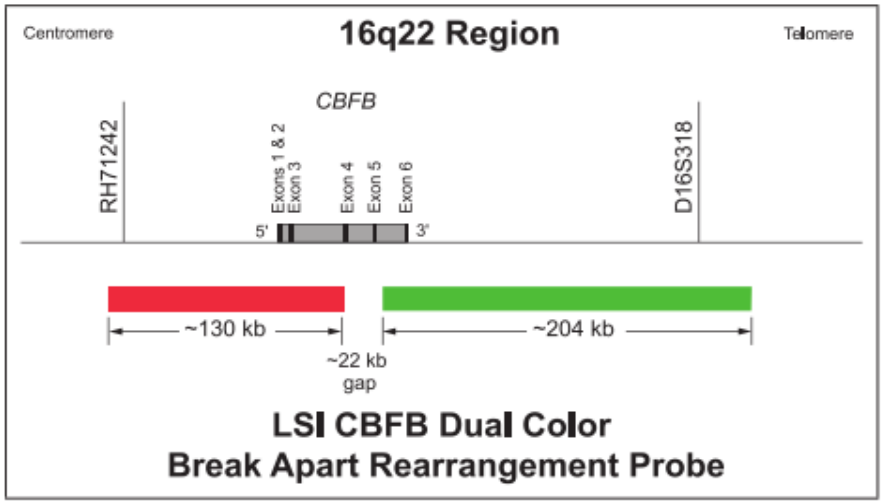
НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Было обнаружено, что абберации на хромосоме 16q22 ассоциированы с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ).[1] Благоприятный исход при ОМЛ был связан с инверсией (16) и транслокацией (16;16).[2,3] Vysis LSI CBFB Dual Color Break Apart Rearrangement проба использовалась для обнаружения инв.(16) трансл. (16;16) при исследовании 237 диагностических образцов от пациентов с ОМЛ, включенных в клиническое исследование.

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Зонд SpectrumRed размером приблизительно 130 кб (chr16: 65525674-65655811, Март 2006)[5] и гибридизуется тромерно в инв (16) и трансл. (16;16) в точках разрыва.
Зонд SpectrumGreen размером приблизительно 204 кб (chr16: 65677619-65881775, Март 2006)[5] и гибридизуется теломерно в точке разрыва.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



Реагенты

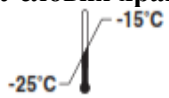
1. Зонд Vysis LSI CBFB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe SpectrumOrange (серия № 30-191008)

(1 флакон, 20 мкл/флакон). 450 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**

(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Зонд Vysis LSI CBFB Break Apart FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis LSI CBFB Break Apart FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**
Медицинское оборудование для диагностики in vitro
Vysis LSI CBFB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[7].
Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[10].

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI CBFB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.
Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[6].

Ожидаемые результаты
Ожидаемый паттерн сигналов для зонда Vysis LSI CBFB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это два слитных сигнала.
Ожидаемый атипичный паттерн сигналов для зонда Vysis LSI CBFB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это один красный, один зеленый и один слитный. Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. **Подготовка слайдов для коденатурации** • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Le Beau MM, Larson RA, Bitter MA, et al. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogeneticclinicopathological association. *N Engl J Med.* 1983;309(11):630-6.
2. Larson RA, Williams SF, Le Beau MM, et al. Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils and inv(16) or t(16;16) has a favorable prognosis. *Blood.* 1986;68(6):1242-9.
3. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 1998;92(7):2322-33.
4. Vance GH, Kim H, Hicks GA, et al. Utility of interphase FISH to stratify patients into cytogenetic risk categories at diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) clinical trial (E1900). *Leuk Res.* 2007;31(5):605-9.
5. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.
6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. 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.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis CBFB Break Apart FISH Probe Kit и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента 5, 491, 224 и патентов 5, 663, 319, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детекции нескольких сигналов одновременно защищены американскими патентами 6, 203, 977 приписанного [2]Иельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020 г.
30-608282/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

en

REF 04N10-020

30-608467/R4

Vysis IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color DF FISH Probe Kit
REF 04N10-020
30-608467/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Трехцветная проба Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion для проведения флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) предназначена для обнаружения рицепрокных транслокаций t (8;14) (q24;32), включающих регионы генов MYC и IGH.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Транслокация **(**8;14) (q24;32) является характерной для лимфомы Беркита и встречается примерно в 80% случаев лимфомы Беркита.[1] Т.о. тестирование на транслокации **(**8;14) (q24;32) или другие варианты указаны как важный тест на лимфому Беркита. В отчетах описано, что трехцветная проба Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion используется для идентификации транслокации **(**8;14) (q24;32).[3,4] Проба аква CEP 8 служит для контроля количества копий 8 хромосомы.

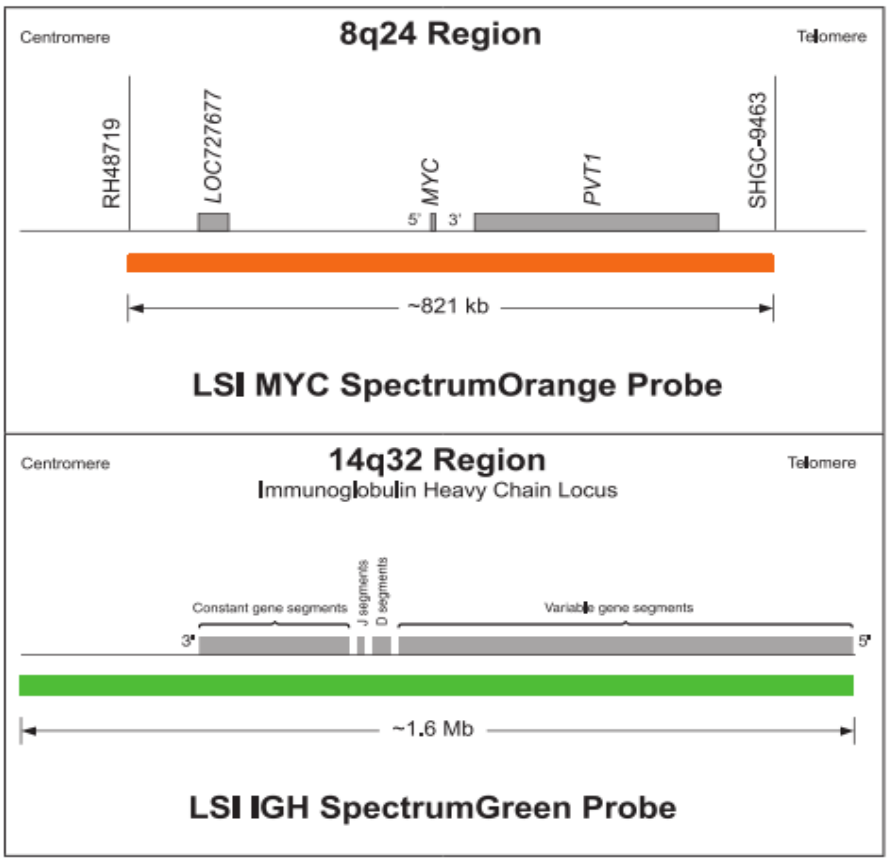
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

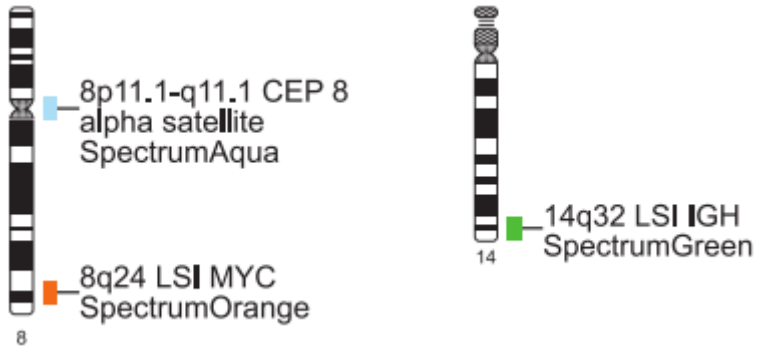
ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Зонд SpectrumOrange размером приблизительно 821 кб (chr8: 128432540-129253747, Март 2006) и охватывает регион гена MYC.

Зонд SpectrumAqua содержит D8Z2 альфа сателлитные последовательности и специфичен к хромосоме 8p11.1-q11.1.

Размером приблизительно 1,6 Мб (chr14: 104736507-106339460, Март 2006) SpectrumGreen проба охватывает регион гена IGH.





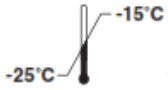
РЕАГЕНТЫ

1. Зонд Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion Probes (серия № 30-191020)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 1025 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия хранения



Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color DF Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Условия транспортировки

Во время транспортировки **LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion FISH Probe** транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Только для диагностического использования *In Vitro*.**

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

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.

Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Сбор образцов и подготовка анализа
Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани должны быть помещены на слайды с использованием стандартных процедур. Для подготовки заключенных в парафин образцов для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимизации проницаемости тканей и гибридизации с помощью стандартных процедур.

Методика
Требуемые материалы
- Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-Color Dual Fusion Probe
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Столик для нагрева стекол с препаратами

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.
- Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
- Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более 4 стекол в сосуды Коплина одновременно.

• Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH**.** ПРИМЕЧАНИЕ**:** Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подержите препараты в 100% этаноле, пока все препараты полностью н высохнут и нанесите пробу.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.**

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: **Если препараты готовы, когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.**

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов.

Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Процедура быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.**

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1– секунды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температура промывочных растворов 73±1ºC, прежде, чем промывать другие 4 слайда.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через интервал от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

- Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
- На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения микроскопических стекол с образцами, пробами и покровными стеклами на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, их удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 мкл очищенной H2O
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации
Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.
Система денатурации/гибридизации ThermoBrite может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (± 1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.
1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа - или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл конткрасителя на целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики
Для интерфазного использования индивидуальные лаборатории должны создать аналитически нормальный cut-off для интересующих паттернов атипичных сигналов.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
Ожидаемые нормальные паттерны сигналов для зонда LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri- Color Dual Fusion Probes это два оранжевых, два зеленых и два голубых сигнала.
Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для пробы LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri- Color Dual Fusion Probes это один оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала и два голубых сигнала. Проба аква CEP 8 служит для контроля количества копий 8 хромосомы. Другие атипичные сигналы могут встречаться и метафазный анализ может быть полезен для характеристики таких паттернов.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	или нарушены условия хранения.	дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Perkins AS, Friedberg JW. Burkitt lymphoma in adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008;341-8.

2. 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. Available at: http:// www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/nhl.pdf. Accessed November 16, 2009.

3. 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.

4. Einerson RR, Law ME, Blair HE, et al. Novel FISH probes designed to detect IGK-MYC and IGL-MYC rearrangements in B-cell lineage malignancy identify a new breakpoint cluster region designated BVR2. *Leukemia.* 2006;20(10):1790-9.

5. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
9. 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.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2010, 2020 Abbott. Все права защищены.

www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608467/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis 9q34 SpectrumAqua FISH Probe Kit

en

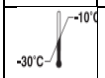
REF 05N53-020

30-608291/R4

Vysis 9q34 SpectrumAqua FISH Probe Kit
REF 05N53-020
30-608291/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор зондов Vysis 9q34 SpectrumAqua FISH Probe Kit предназначен для обнаружения делеции целевой области зонда Vysis 9q34 с использованием метода флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

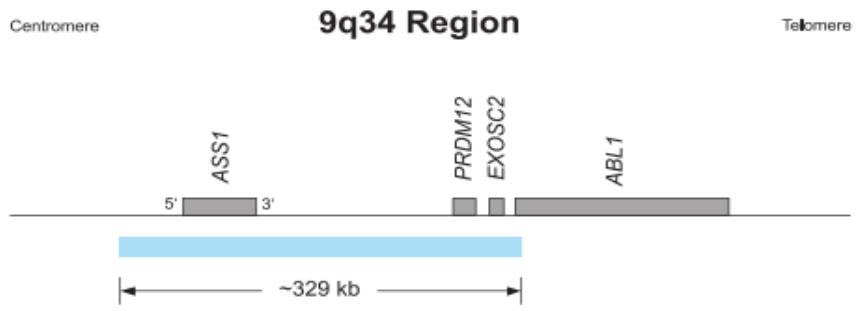
НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ) имеет характерную транслокацию t (9;22) (q34;q11.2), которая приводит к слиянию генов BCR и ABL1. У небольшой подгруппы пациентов была выявлена делеция региона 9q34 проксимальнее точки разрыва гена ABL1, которая также включает ген аргиносульфатсинтетазы (ASS1).[1] В двух различных исследованиях пациентов с ХМЛ с зондом Vysis 9q34 SpectrumAqua показано выявление делеции региона 9q34.[1,2]

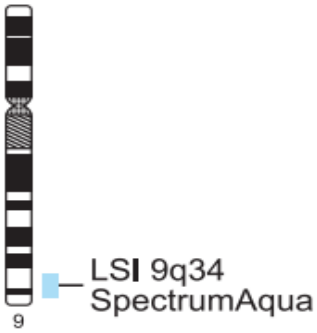
ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером приблизительно 329 кб (chr9:132255025-132584487; Март 2006 г.) зонд SpectrumAqua охватывает ген ASS1 на хромосоме 9q34.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



LSI 9q34 SpectrumAqua Probe



Реагенты

1. Зонд Vysis LSI 9q34 SpectrumAqua Probe (серия № 30-191072)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 200 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804824)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения

Зонд Vysis 9q34 SpectrumAqua FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±10°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis 9q34 SpectrumAqua FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**
Vysis LSI 9q34 SpectrumAqua Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI 9q34 SpectrumAqua Probe
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид ультравысокой очистки
- Контрастирующий краситель DAPI II
- Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.

1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.

3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).

ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.

ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.
Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
Ожидаемые нормальные паттерны сигналов для пробы 9q34 SpectrumAqua это два голубых сигнала.
Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для пробы 9q34 SpectrumAqua это один голубой сигнал, представляющий делецию 9q34. Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Ограничения при использовании
Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[6].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Aoun P, Wiggins M, Pickering D, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization studies for the detection of 9q34 deletions in chronic myelogenous leukemia: a practical approach to clinical diagnosis. *Can Gen Cytogen.* 2004;154:138-143.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Smoley SA, Brockman SR, Paternoster SF, et al. A novel tricolor, dual-fusion fluorescence in situ hybridization method to detect BCR/ ABL fusion in cells with t(9;22)(q34;q11.2) associated with deletion of DNA on the derivative chromosome 9 in chronic myelocytic leukemia. *Can Gen Cytogen.* 2004;148:16.
3. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
4. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka 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. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
6. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline –Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
8. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI 9q34 SpectrumAqua Probe защищены Европейскими патентами EP 0 549 709 B1 и дающего Abbott Molecular эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608291/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IGH/MALT1 DF FISH Probe Kit

en

REF 05N47-020

30-608285/R3

Vysis IGH/MALT1 DF
FISH Probe Kit
REF 05N47-020
30-608285/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор зондов Vysis IGH/MALT1 DF FISH Probe Kit предназначен для выявления t (14;18) (q32;q21) рицепрокных транслокаций, включающих регион генов IGH и MALT1 с использованием флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

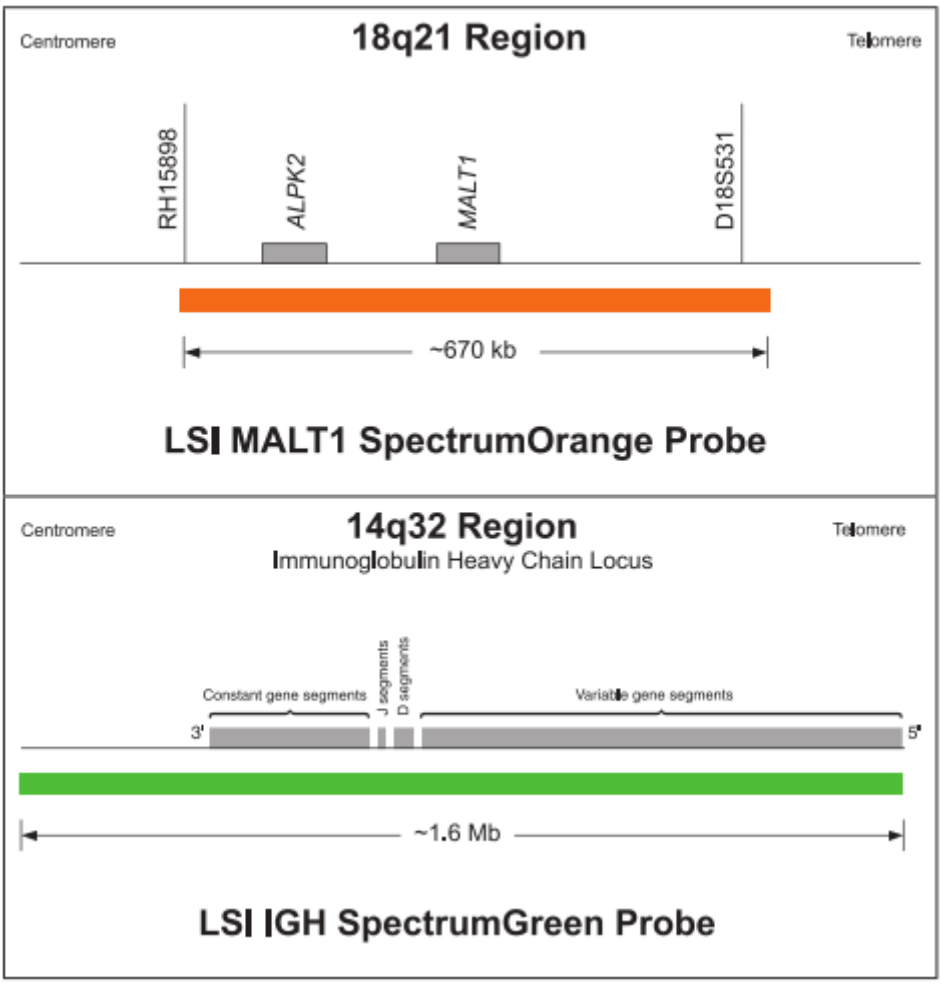
Транслокация t(14;18) (q32;q21) является второй по распространённости хромосомной транслокацией, обнаруженной в лифоидной ткани, связанной со слизистой оболочкой (MALT1) лимфома[1] и является наиболее распространённой среди не желудочных MALT-лимфом.[3,4] Транслокация t(14;18) (q32; q21) используется в диагностике MALT-лимфом[3,4] В опубликованных отчетах the Vysis LSI IGH/MALT1 Dual Color Dual Fusion Probes были использованы для определения транслокаций t(14;18) (q32;q21)[5].

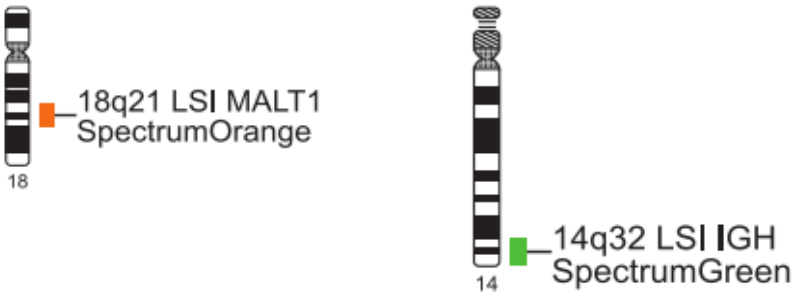
ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Зонд SpectrumOrange размером приблизительно 670 Kb (chr18:54220804-54891192; Март 2006 г.) охватывает ген MALT1.

Зонд SpectrumGreen размером приблизительно 1.6 Mb охватывает регион гена IGH (chr14:104736507-106339460; Март 2006 г.)[6]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



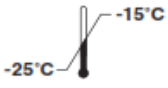


РЕАГЕНТЫ:

1. Vysis LSI IGH/MALT1 Dual Color Dual Fusion Probes (Номер партии №30-231005) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 1000 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.

2. Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826) (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Зонд Vysis IGH/MALT1 DF FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis IGH/MALT1 DF FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

Предназначен только для диагностики *in vitro*.

Vysis LSI IGH/MALT1 Dual Color Dual Fusion Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[9], CLSI документ M29-A3[10], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[11].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света.
Разрушение: под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Залитые в формалин, заключенные в парафин образцы опухолевой ткани помещались на слайды с использованием стандартных цитогенетических процедур.
Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI IGH/MALT1 Dual Color Dual Fusion Probes
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP®

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Приготовление целевого образца
ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.
1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погружайте не более, чем 4 препарата одновременно.
3. Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

Приготовление пробной смеси
1. Добавьте следующие ингредиенты для каждой целевой области, в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.
2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73±1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.
1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов. Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Методика быстрой помывки
ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2XSSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:
- Налейте 70 мл 0.4XSSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.

- Налейте 70 мл 2XSSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.
1. Удалите покровное стекло одного препарата и немедленно погрузите препарат в 0.4X SSC/0.3% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Повторите эту манипуляцию с каждым препаратом.
2. Удалите препараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температуре отмывочного раствора составляет 73±1°C до помывки других препаратов.

3. Погрузите препараты в 2XSSC/0.1% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Удалите препараты через 5 секунд - 1 минуту.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: Препараты, которые хранятся при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте могут быть проанализированы в течение, по крайней мере, 3 недель после гибридизации.

Использование коденатурации
Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения препаратов образцов с пробами и покровными стеклами, на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, препараты удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Опис
анные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
2 мкл очищенной H_2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H_2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite™. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite™ может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа-или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл красителя в целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена с использованием соответствующих контролей и аналитических методик наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования. Один из способов выполнения этого метода описан Wiktor и др[7].

Ожидаемые результаты

Ожидаемый нормальный сигнал для пробы Vysis LSI IGH/MALT1 Dual Color Dual Fusion Probes это два оранжевых и два зеленых сигнала. Ожидаемый абнормальный сигнал для пробы Vysis LSI IGH/CCND1 Dual Color Dual Fusion один оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала. Могут возникать и другие нетипичные сигналы, и метафазный анализ может быть полезен для характеристики таких сигналов.

Устранение неисправностей в отношении результатов количественного определения коденатурации

Морфология хромосомы, наблюдаемая во время гибридизации с применением коденатурации, может отличаться от образца, который был денатурирован и дегидрирован до применения пробы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C.
Тусклая проба	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Увеличьте время гибридизации • Повысьте температуру плавления. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как морфология станет приемлемой. • Отмойте слайд с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 70-73°C.
Диффузный сигнал	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Отмойте с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 73-76°C.
Плохая морфология метафазы	Повторите количественное определение, на новом образце используя следующее: • Снизьте температуру плавления на 2°C. • Снизьте время плавления • ПРИМЕЧАНИЕ: При необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Предварительно обработайте препараты: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите препарат в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3.Погрузите препарат несколько раз в очищенную воду. 4. Дегидрируйте препараты путем нескольких моек в EtOH длительностью 1 минута (70%, 85%, 100%). 5. Высушите препараты на воздухе и продолжайте приготовления препарата для коденатурации. • Если морфология продолжает оставаться плохой, модифицируйте использование инструмента HYBrite: 1. Приготовьте 280 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации (196 нл формамида/28 нл 2X SSC/56 нл очищенной H2O). 2. Включите программу холодной температуры HYBrite при 73°C. 3. Поместите 10 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации в каждую целевую область и накройте покровным стеклом. 4. При достижении HYBrite 73°C, поместите препараты на нагревательную поверхность. Закройте крышку. 5. Удалите препараты через 3 минуты. 6. Удалите покровные стекла. 7. Продолжите шаги по дегидрации в процессе приготовления целевого образца по методике количественно определения коденатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение неполадок

При анализе результатов количественного определения FISH, убедитесь, что ваш микроскоп правильно настроен и оптимально функционирует. В следующей таблице приведены некоторые результаты, которые вы можете получить в процессе выполнения проб LSI. Возможные причины и предложения по улучшению качества процесса приведены ниже.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Искажение морфологии хромосом	Препараты высохли слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани для сушки препаратов. Понизьте температуру сушки во время приготовления. Увеличьте время сушки до ночи при комнатной температуре, затем выдержите, по крайней мере, 24 часа при комнатной температуре. Не сушите препараты при высокой температуре.
	Образец пере-денатурирован.	Убедитесь, что раствор для денатурации был произведен согласно инструкции. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C до погружения препарата, снизьте температуру до 72°C. Уменьшите время погружения препарата в раствор на 1-3 минуты.
	Образца препаратов не до конца высохли перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образцы препаратов до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты сериями моек EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%, 100%).
	Препараты образцов слишком свежие для денатурации.	Выдержите слайды, по крайней мере, в течение 24 часов при комнатной температуре.
Высокий фон препарата	Стекла не достаточно очищены до приготовления препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите досуха с использованием нетканой бумаги.
	Клеточный детрит.	Отмойте клеточный детрит свежим фиксатором трижды и повторите процедуру.
	Выдерживание метафаз слишком длительное или содержит цитоплазму.	Увеличьте время погружения раствора денатурации до 10 минут.
	Препарат недостаточно отмыт в процессе гибридизации.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что pH и температура отмывочных растворов правильные. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру мойки.
Высокий фон препарата	Отмывочные растворы используются слишком долго или хранятся неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы, содержащие формамид, должны храниться при температуре при 4°C. Утилизировать через 7 дней частого использования. Утилизировать все остальные отмывочные растворы через 1 день. Убедитесь, что pH формамида составляет 7 0.8 0
	Видимая гибридизация с использованием длинных полосных фильтров.	Переключитесь на фильтры с меньшей шириной полос или мультиполосных фильтров для ограничения фонового света.
Слабый сигнал или отсутствие сигнала	Препарат образца неадекватно денатурирован.	Убедитесь, что температура раствора для денатурации в сосуде Коплина составляет 73±1°C до погружения препарата. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74°C. Увеличьте время погружения препарата в раствор для денатурации на 2-4 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Препарат образца не достаточно подготовлен для FISH.	Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для протоколов, описывающих способ приготовления образца для FISH.
	Препараты образца неправильно выдержаны после использования.	Выдержите 24 часа при комнатной температуре до проведения FISH.
	Препараты образца не достаточно сухие перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образец до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты через серии моек в EtOH (70%, 85%, 100%).
	Образец был недостаточно смешан	Использование трипсин – Гимзе полосных образцов для FISH может потребовать регулирования полосности или протоколов гибридизации. Для дальнейшей информации по полосности перед FISH, свяжитесь с технической службой Abbott Molecular. Или приготовьте свежие препараты.
	Проба не добавлена	Приготовьте новую пробную смесь. Дайте пробе отмокнуть. Перемешайте реагенты, центрифугируйте. Медленно отмерьте пипеткой.
	Проба, буфер для гибридизации, и пробная смесь не были хорошо смешаны перед использованием.	Перемешайте или отмерьте пипеткой реагенты перед смешиванием, центрифугируйте.
	Пробы неправильно разведены для гибридизации.	Используйте объемы, заявленные в методике для поддержания соотношения пробной смеси (7 нл буфера для гибридизации: 1 нл пробы: 2 нл очищенной H2O). Убедитесь, что пипетка калибрована. Оставьте буфер для гибридизации на некоторое время и дайте ему достигнуть комнатной температуры перед использованием, медленно отмерьте пипеткой.
	Проба неправильно денатурирована. ПРИМЕЧАНИЕ: Не относится к пробам, поставляемым в буфере для гибридизации или денатурированном виде.	Убедитесь, что температура водяной бани использованной для денатурации пробной смеси составляет 73±1°C Денатурируйте пробную смесь в течение 5 минут.
	Проба не использована в отношении целевого образца сразу же после денатурации.	Спланируйте так, что пробы немедленно будет использована после того, как препараты извлечены из раствора 100% EtOH solution. Убедитесь, что EtOH испарился. Удалите пробирку, содержащую пробную смесь из 73±1°C водяной бани и немедленно поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C. Держите пробирку на нагревателе препаратов во время того, как отмериваете пипеткой пробу на препарат. Обработайте максимальное количество препаратов и поддерживайте правильные температуры и время обработки согласно методике.
Слабый сигнал или его отсутствие	Пробная смесь слишком сухая на препарате образца.	Немедленно поместите покровное стекло на целевую область после обработки пробной смеси. При помывке, удалите покровное стекло с 1 препарата и немедленно погрузите препарат в отмывочный раствор до удаления покровного стекла со следующего препарата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло путем касания поверхности пробной смеси. Поместите препарат с покровным стеклом в блоттер и мягко выдавите пузырьки воздуха.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что заявленное время и температура гибридизации были соблюдены. Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C. Закрепите покровное стекло резиновым цементом, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Условия помывки или отмывочные растворы приготовлены неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что температуры отмывочных растворов для методики соблюдены. Убедитесь, что термометры и pH метры откалиброваны правильно. Удалите покровные стекла до погружения препаратов в отмывочный раствор.
	Пробы или препараты образцов неправильно хранятся.	Храните неразведенную пробу при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Храните негибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в течение продолжительного времени или при комнатной температуре в течение короткого периода времени. Храните гибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте с течение 3 недель.
	Использован неправильный краситель. Краситель слишком яркий.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты путем погружений в EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%,100%). Высушите препараты на воздухе и снова обработайте красителем.
	Видимая гибридизация с использованием несоответствующего набора фильтров.	Наборы мультиполосных фильтров обеспечивают меньше света, чем одиночные наборы фильтров, поэтому пробные сигналы могут побледнеть при просмотре с помощью мультиполосных наборов фильтров. Используйте правильный фильтр для просмотра флуорофоров пробы. Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для получения дальнейшей информации.
	Не соответствующая результатам FISH конфигурация микроскопа, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Пробы разведены не соответствующим образом, часто слишком много пробы для количественного определения.	Убедитесь, что пробная смесь была сделана согласно инструкции.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C.
	Температура помывки слишком низкая.	Убедитесь, что буфер для гибридизации был добавлен к пробной смеси в соответствующем количестве.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Поддерживайте температуру отмывочных растворов путем помещения 4 сосудов в сосуд Коплина и убедитесь, что температура отмывочного раствора правильная до мойки препаратов.
	Точность приготовления отмывочного раствора очень низкая.	Убедитесь, что отмывочные растворы были сделаны согласно инструкции. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем точнее приготовление.
Яркое или слабое окрашивание	Слабое окрашивание: препараты не достаточно дегидрированы до окрашивания или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты серией 1-минутных моек в EtOH (70%, 85%,100%). Высушите на воздухе и снова добавьте краситель.
	Неправильная концентрация красителя. ПРИМЕЧАНИЕ: краситель DAPI I в 8 раз более концентрированный, чем DAPI II.	Если окрашивание слишком яркое, разведите краситель в растворе (Список номер. 06J29-010) до использования.
	Краситель слишком старый или хранился на свету в течение продолжительного периода времени.	Храните краситель при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Mullauer L, et al. Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia* 2004;18(10):1722-6.
2. Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, et al. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 2003;101(6):2335-9.
3. Gomyo H, Kajimoto K, Maeda A, et al. t(14;18)(q32;q21)-bearing pleural MALT lymphoma with IgM paraproteinemia: value of detection of specific cytogenetic abnormalities in the differential diagnosis of MALT lymphoma and lymphoplasmacytic lymphoma. *Hematology* 2007;12(4):315-8.
4. Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: non-Hodgkin's lymphomas. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010;(8)3:288-334.
5. Bhagavathi S, Greiner TC, Kazmi SA, et al. Extranodal marginal zone lymphoma of the dura mater with IgH/MALT1 translocation and review of literature. *J Hematopathol* 2008;1(2):131-7.
6. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research* 2002;12(6):996-1006.
7. 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.
8. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and
Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
10. 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.
11. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт компании http://www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020
30-608285/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/ CEP 15 FISH Probe Kit

en

REF 05N35-020

30-608273/R4

Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/ CEP 15 FISH Probe Kit
REF 05N35-020
30-608273/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-30°C -10°C	Температурные ограничения
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Биологический риск
	Опасность
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Проба Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH предназначена для детекции количества копий мишеней генов D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH, расположенных в локусах 5p15.2, 9p11.1-q11.1 и 15p11-q11.1 соответственно с использованием флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Гиперплоидия - одна из цитогенетических подгрупп множественной миеломы (ММ) и пациенты с гиперплоидией, как сообщается, имеют лучший результат, чем пациенты без гиперплоидов. В исследовании 205 пациентов с множественной миеломой, ДНК-зонд Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 использовали для детекции гиперплоидии[1]. 657 пациентов в исследовании IFM99, проведенное Francophone du Mye´lome также были протестированы на гиперплоидность с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

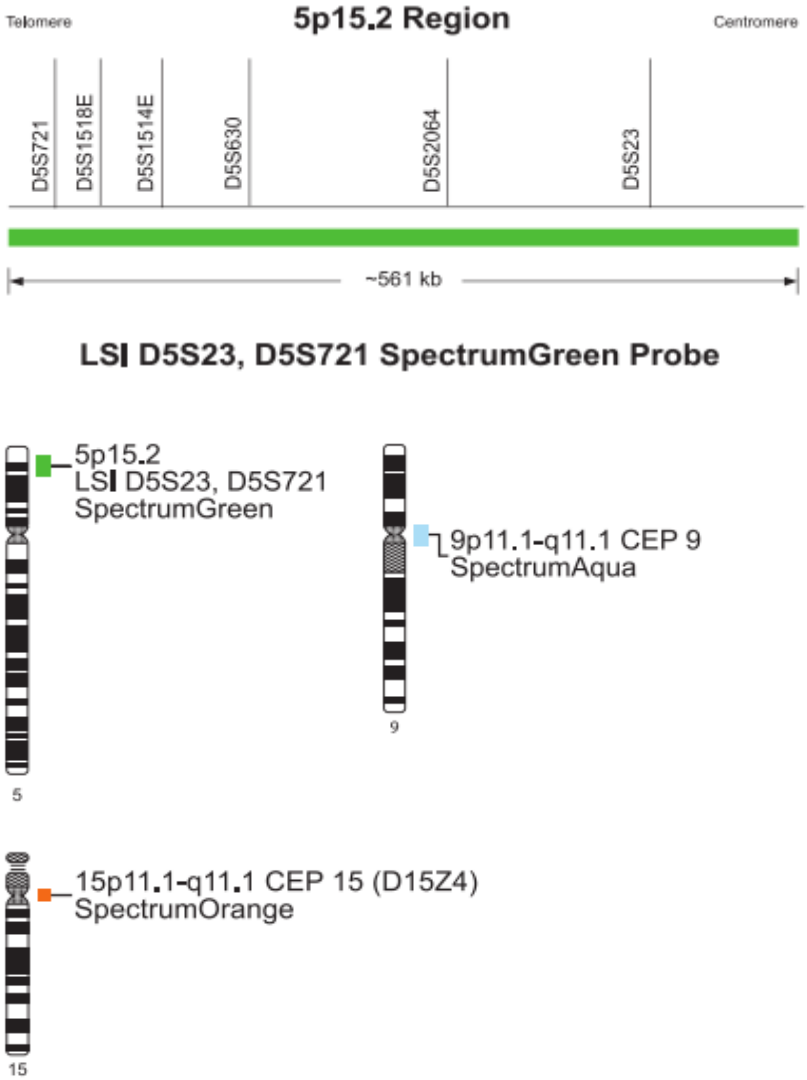
использованием набора зондов Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH. У 39% из этих пациентов была обнаружена гиперплоидия[2].

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

Размером приблизительно 561 Kb (chr:94550109-10011407; Март 2006)[3] зонд SpectrumGreen располагается на хромосоме 5p15.2.

SpectrumAqua проба содержит альфа-саттелитные последовательности и специфична для хромосомы 9p11.1-q11.1.

SpectrumOrange проба содержит D15Z4 альфа-саттелитные последовательности и специфична для хромосомы 15p11.1-q11.1.



РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen/CEP 9 SpectrumAqua /CEP 15 SpectrumOrange Probes (№ 30-231021)

(1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 292,5 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804824)

(1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0). Таблицы с данными о безопасности материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение

Зонд Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 для FISH методики необходимо хранить при температуре -20ºC (±10°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 для FISH методики осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis D5S23, D5S721 SpectrumGreen /CEP 9 SpectrumAqua/CEP 15 SpectrumOrange Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[7]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P501 Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ВНИМАНИЕ: Только для профессиональных пользователей. Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Подготовка реагентов:
ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор

Смешайте 100 мл 20XSSC (pH5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)

Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)

Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC/0,3% NP-40 раствор для быстрой отмывки

Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC, в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика
Необходимые материалы

- Зонды Vysis LSI D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)
ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.
1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.

2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры
Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.
При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Ннн Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ожидаемые результаты

Ожидаемый сигнальный паттерн зонда Vysis LSI D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 – это два оранжевых сигнала и два зеленых и два голубых сигнала. Другие паттерны сигналов в количестве больше двух являются абнормальными. Ожидаемые типичные абнормальные паттерны для зонда Vysis LSI D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 при гипердиплоидной миеломе по крайней мере для двух или трех проб это больше, чем два сигнала. Другие абнормальные паттерны сигналов тоже могут встречаться и в интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

ОГРАНИЧЕНИЯ В ИСПОЛЬЗОВАНИИ

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[4].

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4XSSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте время гибридизации. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2XSSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2XSSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2XSSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь, что значения pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многополосные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза) (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые температуру и временные промежутки в соответствии с методикой анализа из данной инструкции.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи герметика, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH–метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многопропускные фильтры дают меньше света, чем однопропускные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многопропускных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Wuilleme S, Robillard N, Lode L, et al. Ploidy, as detected by fluorescence in-situ hybridization, defines different sub-groups in multiple myeloma. *Leukemia.* 2005;19:275-78.
2. Avet-Louiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myerlome. *Blood.* 2007;109:3489-95.
3. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006
4. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka 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. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
6. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
8. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Техническая поддержка:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

The Vysis LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen/ CEP 9 SpectrumAqua/ CEP 15 SpectrumOrange Probes защищена Европейскими патентами EP 0 549 709 B1 и дающего Abbott Molecular эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

2010, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608273/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis MALT1 Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 05N48-020

30-608286/R3

Vysis MALT1 Break Apart FISH Probe Kit
REF 05N48-020
30-608286/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis MALT1 Break Apart предназначен для обнаружения хромосомных перестроек в локусе MALT1 на хромосоме 18q21 с использованием технологии флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

При MALT1-лимфоме желудка отмечено 1/3 случаев, несущих транслокацию t (11;18) BIRC3-MALT1. Эта транслокация обычно свидетельствует о невосприимчивости к эрадиации H. Pylori и присутствует в запущенном болезненном состоянии.

Vysis MALT1 Dual Color Break Apart Rearangement зонд используется для детекции перестроек области гена MALT1 в исследовании 90 диагностических образцов, полученных от пациентов с MALT1 лимфомой желудка. При аналогичном исследовании также было обнаружено, что у

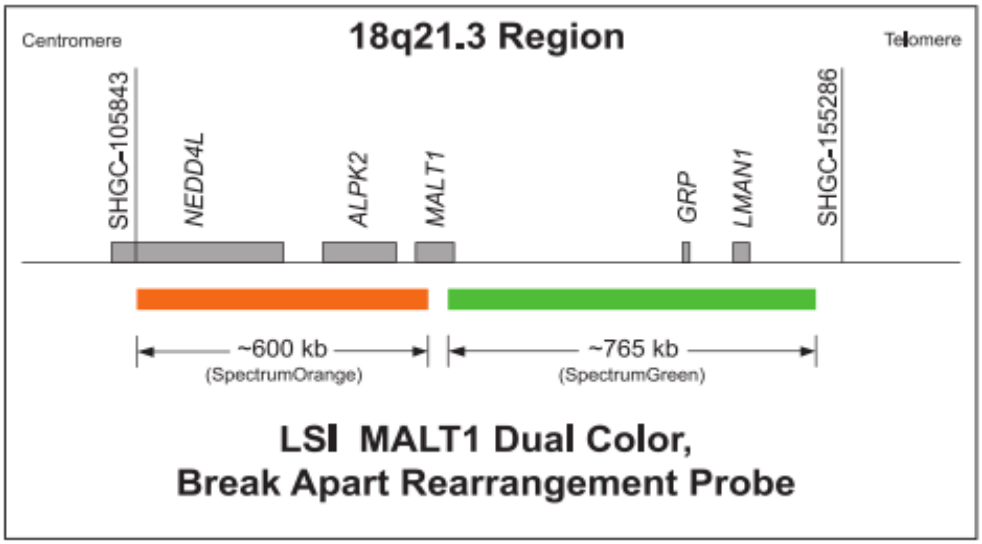
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

некоторых пациентов были дополнительные копии неповрежденного гена MALT1, обозначенного более чем двумя копиями сигнала fusion и это является индикатором плохого прогноза[1]. Другое проведенное исследование для определения клинической чувствительности Ритуксимаба у 27 пациентов, резистентных к или не соответствующих критериям анти H. pylori также использовался зонд MALT1 Dual Color Break Apart Rearrangement для выявления перестроек в регионе гена MALT1.[2]

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером приблизительно 600 Kb (chr18: 5391533454515608; март 2006, Геномный браузер)[3] проба SpectrumOrange лежит в центромерной части в регионе точки разрыва гена MALT1.

Размером приблизительно 756 Kb (chr18: 54554621-55319779; март 2006, Геномный браузер)[3] проба SpectrumGreen лежит в теломерной части регионе точки разрыва гена MALT1.

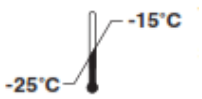


РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI MALT1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Номер партии 30-190055).
(1 флакон, 10 мкл/флакон). 400 нг/мкл, меченая флуорохромом ДНК-проба и блокирующая ДНК в ТРрис-ЭДТА.

2. Vysis LSI/WCP Гибридизационный буфер (Номер партии 30-804826)
(1 флакон, 150 мкл на флакон). Сульфат декстарана, формамид, SSC (pH 7.0).

Хранение



Vysis MALT1 Break Apart FISH Probe Kit хранится при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия транспортировки

Транспортировка зонда MALT1 Break Apart FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI MALT1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки:

• Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).
Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC, в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Фиксированные в формалине, заключенные в парафин образцы тканей помещаются на слайды с использованием стандартных процедур.
Для подготовки образцов, заключенных в парафин для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимальной проницаемости тканей и гибридизации с использованием стандартных процедур.

Методика
Необходимые материалы
- Зонды Vysis LSI MALT1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
    - Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
    - Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
    - pH метр
    - Чистые стекла для микроскопа
    - Очищенная вода
    - Таймер
    - Вихревая мешалка (vortex)
    - Водяная баня (37ºC и 72ºC)
    - Флуоресцентный микроскоп
    - Термостат на 37ºC
    - 20X SSC
    - NP-40
    - Формамид, очень высокой степени очистки
    - Краситель DAPI II
    - Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов
1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Положительные и отрицательные контрольные слайды должны использоваться вместе с образцами пациентов.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[4].

Ожидаемые результаты

Ожидаемые нормальные паттерны сигналов пробы MALT1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это два слитных сигнала.

Ожидаемые атипичные паттерны MALT1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Могут возникать другие атипичные паттерны сигналов, в том числе с более чем двумя копиями слитных сигналов, описанных Nakamura[1].

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0–8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Увеличьте продолжительность гибридизации.
	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Nakamura S, Ye H, Bacon CM, et al. Clinical impact of genetic aberrations in gastric MALT lymphoma: a comprehensive analysis using interphase fluorescence in situ hybridization. *Gut* 2007;56:1358-63.
2. Martinelli G, Laszlo D, Ferreri AJM, et al. Clinical activity of Rituximab in gastric marginal zone non-Hodgkin's lymphoma resistant to or not eligible for anti-Helicobacter pylori therapy. *J Clin Oncol* 2005;23(9):1979-83.
3. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res* 2002;2(6):996-1006.
4. 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.
5. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020
30-608286/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis MYC Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 01N63-020

30-608229/R3

Vysis MYC Break Apart
FISH Probe Kit
REF 01N63-020
30-608229/R4

Обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement при проведении флуоресцентной in situ гибридизации предназначен для детекции хромосомных перестроек, захватывающих регион гена MYC на хромосоме 8q24. Это особенно полезно для детекции аббераций с точками разрыва, расположенными далеко от теломерной области гена MYC, например те, которые могут встречаться при транслокации t (8;22) (q24.1; q11.2) IGL-MYC и транслокации t (2;8) (p11.2; q24.1) IGK-MYC – перегруппировки.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Транслокации, вовлекающие регион гена MYC имеют диагностическую и прогностическую важность при В-клеточных новообразованиях. При лимфомах Берккита приблизительно в 75-80% случаях происходит транслокация t (8;14) IGH-MYC, а в остальных случаях, связанных с

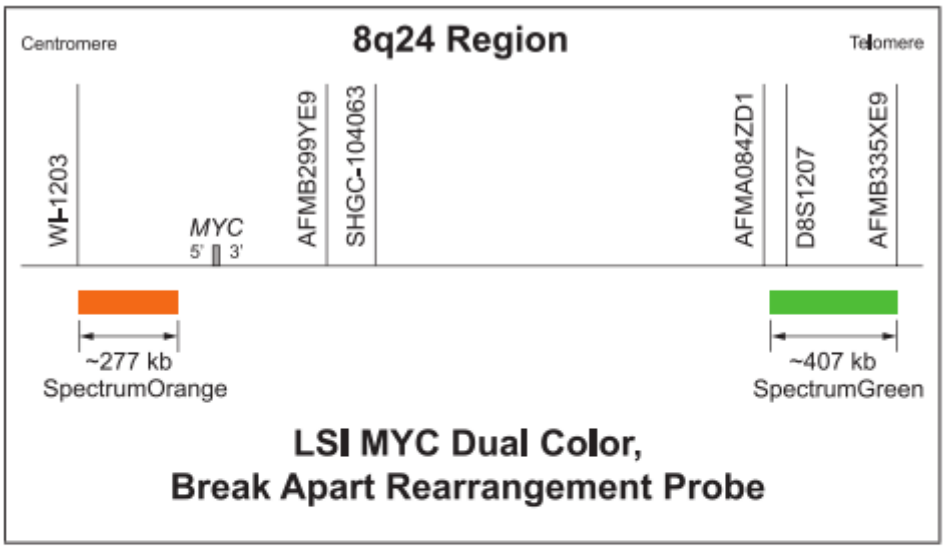
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

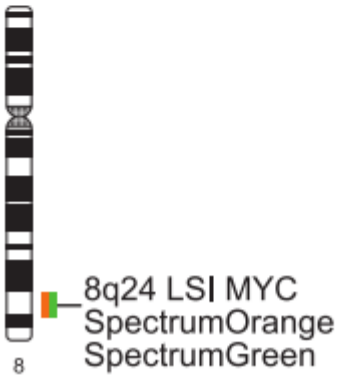
транслокацией t (8;22) IGL-MYC или транслокацией t (2;8) IGK-MYC[1]. Примерно от 5 до 10% пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой также имеют перестройки гена MYC и обнаружение этих перестроек с помощью ДНК-пробы MYC Dual Color Break Apart связано с неблагоприятным прогнозом.[2,3] Было предложено, что FISH-анализ на перегруппировку гена MYC следует проводить для всех пациентов с диффузной В-клеточной лимфомой.

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером приблизительно 277 Кб (chr8: 128432540-128709819; Март 2006)[4] проба SpectrumOrange начинается с 119 Kb центромерной области гена MYC и является центромерным по отношению к точке разрыва.

Размером приблизительно 407 Кб (chr8: 130338931-130745615; Март 2006)[4] проба SpectrumGreen начинается с 1,5 Мб к теломерной области гена MYC и эта теломерная часть является точкой разрыва, наблюдаемая при транслокациях t (8;22) и t (2;8).[5]

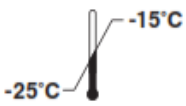




РЕАГЕНТЫ

1. **Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement (Номер партии – 30-191096)**
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 400 нг/мкл, меченая флуорохромом ДНК-проба и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА.
2. **Vysis LSI/WCP Гибридизационный буфер (Номер партии 30-804826)**

ХРАНЕНИЕ



Vysis MYC Break Apart FISH Probe Kit хранится при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis MYC Break Apart FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[9], CLSI документ M29-A3[10], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[11].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[8].

Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[11]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки:

• Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Фиксированные в формалине, заключенные в парафин образцы тканей помещаются на слайды с использованием стандартных процедур.
Для подготовки образцов, заключенных в парафин для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимальной проницаемости тканей и гибридизации с использованием стандартных процедур.

Методика
Необходимые материалы
- Зонды Vysis MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.
   ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Положительные и отрицательные контрольные слайды должны использоваться вместе с образцами пациентов.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

Для интерфазного использования, отдельные лаборатории должны публиковать аналитически нормальную точку отсечения для интересующего атипичного паттерна сигналов[6]. Регион точки разрыва гена MYC может быть расположен в таком большом диапазоне как 2 Mb. Реже точка разрыва может встречаться за пределами пробы и может остаться незамеченной[7].

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Ожидаемый нормальный паттерн сигнала для зонда MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это два слитных сигнала.

Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для зонда MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это один оранжевый, один зеленый, и один слитный сигнал. Могут встречаться другие атипичные сигналы паттернов и метафазный анализ может быть полезным для характеристики таких паттернов.

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Увеличьте продолжительность гибридизации.
	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Perkins AS, Friedberg JW. Burkitt lymphoma in adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008;341-8.
2. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, et al. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia.* 2008;22(12):2226-9.
3. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy*Blood.* 2009;114(17):3533-7.
4. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Einerson RR, Law ME, Blair HE, et al. Novel FISH probes designed to detect IGK-MYC and IGL-MYC rearrangements in B-cell lineage malignancy identify a new breakpoint cluster region designated BVR2. *Leukemia.* 2006;20(10):1790-9.
6. 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.
7. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood.* 2009;114(11):2273-9.
8. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
10. 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, PA 19087-1898 USA.
11. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020
30-608229/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis BIRC3/MALT1 DF FISH Probe Kit

en

REF 05N50-020

30-608288/R3

Vysis BIRC3/MALT1 DF FISH Probe Kit
REF 05N50-020
30-608288/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis BIRC3/MALT1 DF FISH Probe Kit предназначен для обнаружения рицепрокных транслокаций t(11;18) (q21;21), включающей регион генов BIRC3 и MALT1 с использованием метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Транслокация t(11;18) (q21;21) наиболее распространённая хромосомная транслокация, обнаруживаемая в лимфоидной ткани, связанной со слизистой оболочкой (MALT1 лимфома)[2]. Транслокация t(11;18) (q21;21) ассоциирована с невозможностью ответа эрадиацию Helicobacter

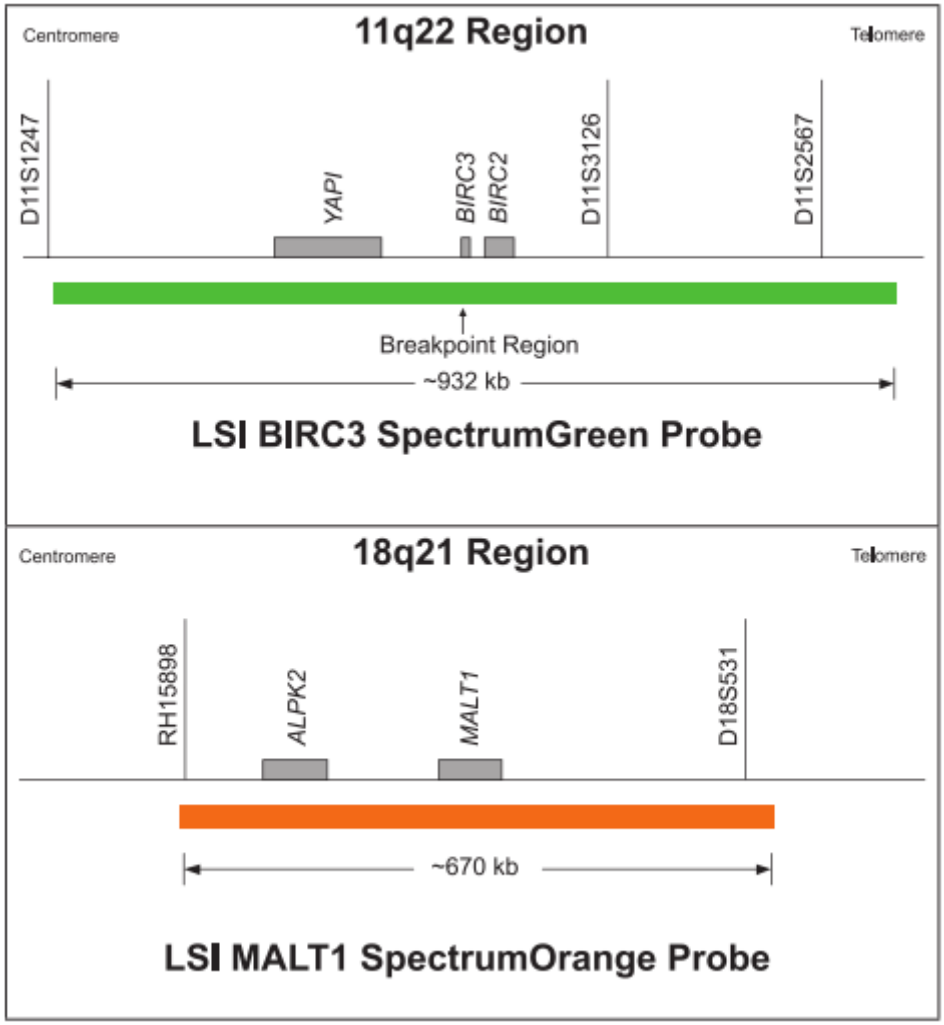
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

pilory и на агрессивное заболевание[3,4]. В опубликованных отчетах Vysis BIRC3/MALT1 Dual Color Dual Fusion используется для идентификации транслокации t(11;18) (q21;21)[5].

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Проба SpectrumOrange размером приблизительно 670 Kb (chr18: 54220804-54891122, Март 2006)[6] и охватывает регион гена MALT1.

Размером приблизительно 932 Kb (chr11:101247706-102179265, Март 2006)[6] SpectrumGreen проба охватывает ген BIRC3.



РЕАГЕНТЫ

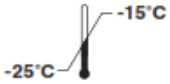
1. **Зонд Vysis LSI BIRC3/MALT1 Dual Color Fusion Probes (номер партии 30-231007)**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 500 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826)
(1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

Хранение



Зонд Vysis BIRC3/MALT1 DF FISH Probe Kit для FISH методики необходимо хранить при температуре -20ºC (±5°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки
Транспортировка зонда Vysis BIRC3/MALT1 DF FISH Probe Kit методики (набор реактивов) осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**
Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis LSI BIRC3/MALT1 Dual Color Dual Fusion Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[9], CLSI документ M29-A3[10], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[11].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[7]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.
Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P501 Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор

Смешайте 100 мл 20XSSC (pH5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)

Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)

Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC/0,3% NP-40 раствор для быстрой отмывки

Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: LSI ДНК зонд должен храниться при температуре не выше -20ºC, в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Фиксированные в формалине, заключенные в парафин образцы тканей помещаются на слайды с использованием стандартных процедур.
Для подготовки образцов, заключенных в парафин для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимальной проницаемости тканей и гибридизации с использованием стандартных процедур.

Методика
Необходимые материалы
- Зонды Vysis MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

• Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
• Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.
ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации
1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.
Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение
Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.
При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов. Один из способов для выполнения этого метода был описан Wiktor и др[7].

Ожидаемые результаты

Ожидаемый нормальный паттерн сигнала для пробы Vysis LSI BIRC3/MALT1 Dual Color Dual Fusion это два оранжевых и два зеленых сигнала.

Ожидаемые атипичные сигналы паттернов для пробы Vysis LSI BIRC3/MALT1 Dual Color Dual Fusion это один оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала. Могут встречаться другие атипичные сигналы паттернов и метафазный анализ может быть полезным для характеристики таких паттернов.

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	микропрепараты недостаточно высушены.	70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

микропрепараты высушены недостаточно.	70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºС в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, et al. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol*. 1997;8(10):979-85.
2. Raderer M, Wohrer S, Streubel B, et al. Assessment of disease dissemination in gastric compared with extragastric mucosaassociated lymphoid tissue lymphoma using extensive staging: a single-center experience. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3136-41.
3. Ye H, Liu H, Raderer M, et al. High incidence of t(11;18)(q21;q21) in Helicobacter pylori-negative gastric MALT lymphoma. *Blood*. 2003;101(7):2547-50.
4. Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmestraux A, et al. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to H. pylori eradication. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1286-94.
5. Nakamura S, Ye H, Bacon CM, et al. Clinical impact of genetic aberrations in gastric MALT lymphoma: a comprehensive analysis using interphase fluorescence in situ hybridisation. *Gut*. 2007;56(10):1358-63.
6. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.
7. 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.
8. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
10. 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.
11. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2010, 2020 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com
Апрель 2020 г.
30-608288/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis CCND1 Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 05N38-020

30-608276/R4

Vysis CCND1 Break Apart FISH Probe Kit

REF 05N38-020

30-608276/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Проба CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement для проведения флуоресцентной гибридизации in (FISH) предназначена для выявления хромосомных перестроек, включающих регион гена Cyclin D1 (CCND1) на хромосоме 11q13.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

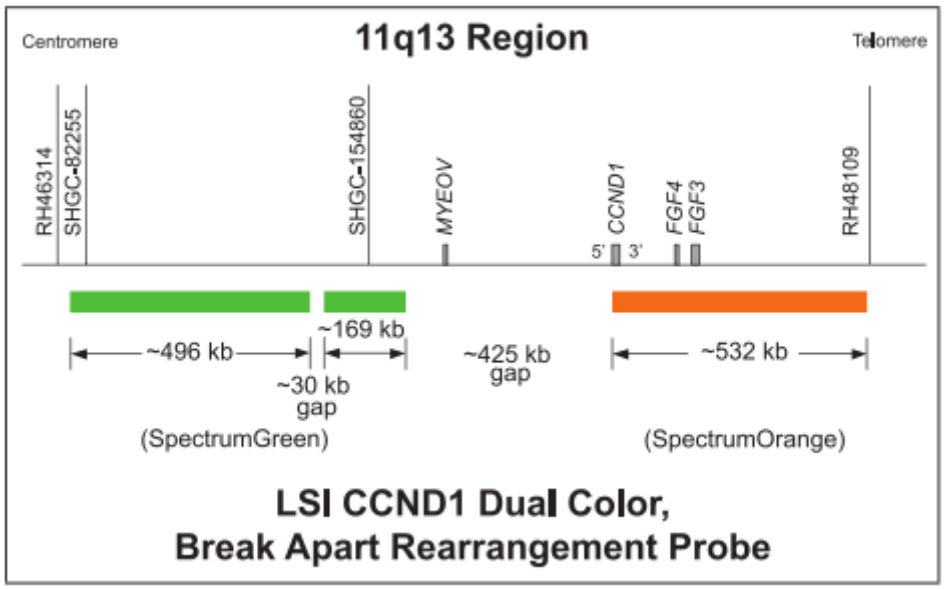
Лимфома мантийной зоны - это агрессивная В-клеточная лимфома, обычно характеризуется гиперэкспрессией CCND1 в результате транслокации t (11;14) (q13;q32)[1]. Гиперэкспрессия CCND1, которая является результатом хромосомных перестроек, таких как транслокации или увеличение числа копий задействованных областей, встречается при множественной миеломе и лимфоме мантийной зоны[2]. Проба CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement предназначена для определения перегруппировки гена CCND1 в точке разрыва при лимфоме мантийной зоны[3].

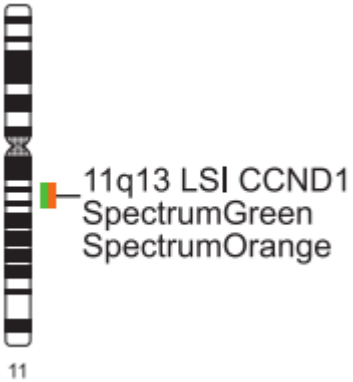
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Зонд SpectrumGreen расположен в центромерной области гена CCND1 размером приблизительно 695 Kb (chr11: 68042961- 68737635; Март 2006 г.) с промежутком приблизительно в 30 000 пар оснований (chr11:68539031- 68568615; Март 2006 г.)[4].

Зонд SpectrumOrange размером приблизительно 532 Kb (chr11: 69162485- 69694376; Март 2006)[4] и охватывает ген CCND1.



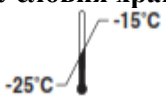


Реагенты

1. Зонд Vysis LSI CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (серия № 30-231031)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 225 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Зонд Vysis CCND1 Break Apart FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis CCND1 Break Apart FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

Предназначен только для диагностики *in vitro*.

Vysis LSI CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Фиксированные в формалине, заключенные в парафин образцы тканей помещаются на слайды с использованием стандартных процедур.
Для подготовки образцов, заключенных в парафин для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимальной проницаемости тканей и гибридизации с использованием стандартных процедур.

Методика
Необходимые материалы
- Зонды LSI CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.
   ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов
1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºС приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºС) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºС.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°С для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°С на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

• Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºС минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
• Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºС.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение
Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации
Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации
1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Положительные и отрицательные контрольные слайды должны использоваться вместе с образцами пациентов.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

Для интерфазного использования, отдельные лаборатории должны публиковать аналитически нормальную точку отсечения для интересующего атипичного паттерна сигналов[5].

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Ожидаемые нормальные паттерны сигналов для пробы CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement это два слитных сигнала. Транслокация, возникающая в результате разделения зонда дает один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал или два оранжевых и два зеленых сигнала. Потеря гена может также указывать на наличие одного слитного или отсутствие оранжевого или зеленого сигналов. Точно также на усиление гена может указывать кратное слияние. Могут возникать и другие атипичные паттерны сигналов, и метафазный анализ может быть полезен в характеристике таких паттернов.

таких паттернов.

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Williams ME, Dreyling MH, Kahl BS, et al. Mantle cell lymphoma: report of the 2009 Mantle Cell Lymphoma Consortium Workshop. *Leukemia & Lymphoma*. 2010;51(3):390-8.
2. Liebisch P, Dohner H. Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006;42(11):1520-9.
3. Bzorek M Sr, Petersen BL, Hansen L. Simultaneous phenotyping and genotyping (FICTION-methodology) on paraffin sections and cytologic specimens: a comparison of 2 different protocols. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(3):279-86.
4. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020
30-608276/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis BCL2 Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 05N51-020

30-608289/R3

Vysis BCL2 Break Apart
FISH Probe Kit
REF 05N51-020
30-608289/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор зондов BCL2 Break Apart FISH Probe Kit предназначен для выявления хромосомных перестроек в локусе гена BCL2 на хромосоме 18q21 с использованием методики флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

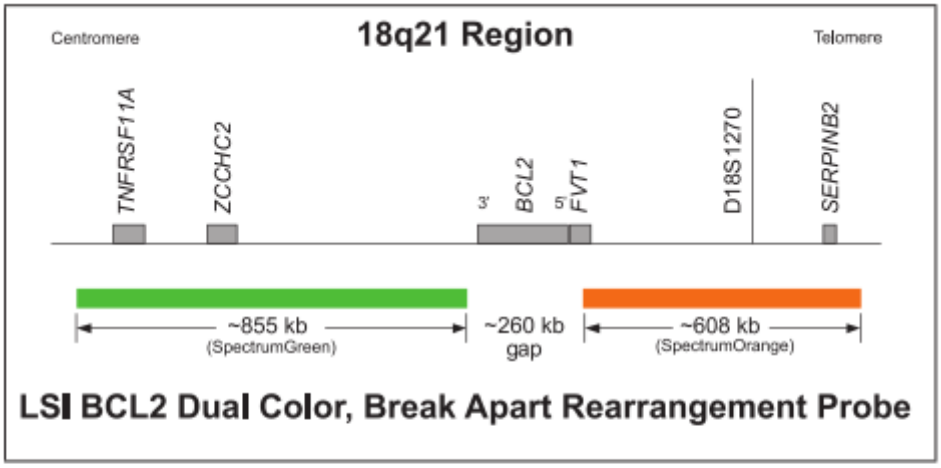
Транслокация t(14;18) (q32;q21) с участием генов IGH, BCL2 наблюдается примерно в 80% случаев фолликулярных лимфом и в 20% случаев диффузных В-крупноклеточных лимфом (ДККЛ)[1]. Перестройки в гене BCL2 показали корреляцию со значительно худшим прогнозом при ДККЛ. Набор зондов Vysis LSI BCL2 Break Apart использовался для выявления перестроек в гене BCL2 на образцах ткани ДККЛ[2,3]. Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома (ПМВКЛ) это ДККЛ с клинически благоприятным прогнозом. В одном исследовании 25 образцов ДККЛ проанализированы методом ПЦР и FISH для обнаружения перестроек гена BCL2[4]. Три случая с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

реаранжировкой гена BCL2 было выявлено с помощью пробы Vysis BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe.

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

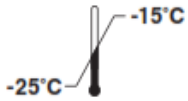
Размером приблизительно 608 Kb (chr18:59173700-59781786 Март 2006, Геномный браузер)[5] проба SpectrumOrange располагается в теломерной области точки разрыва гена BCL2. Размером приблизительно 855 Kb (chr18: 5805886-58913398; Март 2006 г., Геномный браузер)[5] проба SpectrumGreen лежит в центромерной области точки разрыва гена BCL2.



РЕАГЕНТЫ

1. **Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Номер партии – 30-231029)** (1 флакон, 20 мкл/флакон). 700 нг/мкл, меченая флуорохромом ДНК-проба и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА.
2. **Vysis LSI/WCP Гибридизационный буфер (Номер партии 30-804826)**

ХРАНЕНИЕ



Vysis BCL2 Break Apart FISH Probe Kit хранится при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis BCL2 Break Apart FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[7].

Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[10]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки:

• Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Сбор образцов и подготовка анализа
Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани должны быть помещены на слайды с использованием стандартных процедур. Для подготовки заключенных в парафин образцов для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимизации проницаемости тканей и гибридизации с помощью стандартных процедур.

Методика
Требуемые материалы
- Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Требуемые, но не предоставляемые материалы
- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Столик для нагрева стекол с препаратами

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.

- Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
- Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более 4 стекол в сосуды Коплина одновременно.

- Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH**. ПРИМЕЧАНИЕ:** Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подержите препараты в 100% этаноле, пока все препараты полностью н высохнут и нанесите пробу.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы, когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов.

Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Процедура быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1– секунды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температура промывочных растворов 73±1ºC, прежде, чем промывать другие 4 слайда.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через интервал от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

- Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
- На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения микроскопических стекол с образцами, пробами и покровными стеклами на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, их удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
1 мкл очищенной H2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа - или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл конткрасителя на целевую область и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Методики контроля качества
Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики
Для интерфазного использования индивидуальные лаборатории должны создать аналитически нормальный cut-off для интересующих паттернов атипичных сигналов.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
Ожидаемые нормальные паттерны сигналов для зонда BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это два слитных сигнала.
Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для зонда BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это один оранжевый, один зеленый и один слитный сигналы.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	микропрепараты недостаточно высушены.	70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºС в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Willis TJ and Dyer MJS. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000;96(3):808–822.
2. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, et al. BCL2 gene aberration as an IPI-independent marker for poor outcome in non-germinal-centre diffuse large B cell lymphoma. *J Clin Path* 2009;62:903-907.
3. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, et al. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J Clin Path* 2009;62:754-756.
4. Dunphy CH, O'Malley DP, Cheng L, et al. Primary Mediastinal B Cell lymphoma: detection of BCL2 gene rearrangements by PCR analysis and FISH. *J Hematop* 2008;1:77-84.
5. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res* 2002;2(6):996-1006
6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 (ISBN1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

2010, 2020 Эббот Лабораториз

www.abbottmolecular.com
Апрель 2020
30-608289/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis MYB SpectrumAqua FISH Probe Kit

en

REF 05N40-020

30-608278/R3

Vysis MYB SpectrumAqua
FISH Probe Kit
REF 05N40-020
30-608278/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Эта проба для проведения флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) предназначена для выявления количества копий гена LSI MYB, расположенного на хромосоме 6q23.

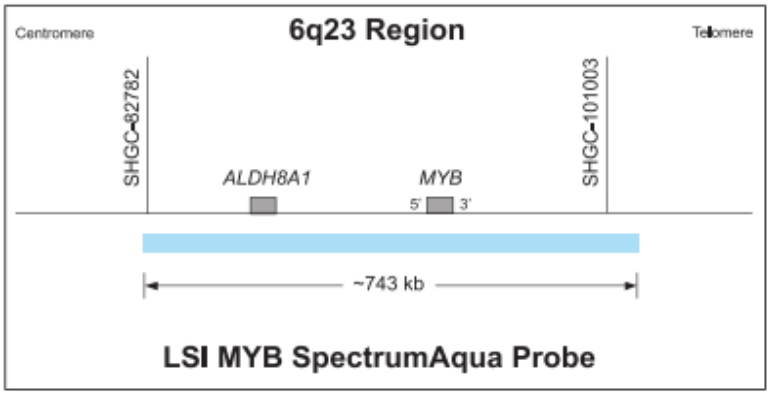
НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

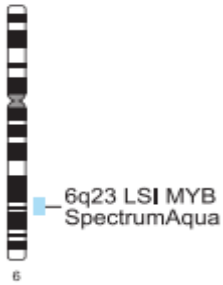
Зонд Vysis LSI SpectrumAqua использовалась для выявления делеции на хромосоме 6q23 при проведении исследований у 143 пациентов с хроническим лимфолейкозом[1]. В этом исследовании приблизительно у 5% пациентов была обнаружена эта делеция.

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Размером приблизительно 743 Kb проба SpectrumAqua LSI MYB (6q23) содержит полностью ген MYB и локализована на хромосоме 6q23 (chr6: 135117337-135860164; Март 2006, Геномный браузер).





РЕАГЕНТЫ

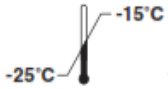
1. Vysis LSI SpectrumAqua (Номер партии 30-231044)

(1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 50 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804826)

(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Vysis MYB SpectrumAqua FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Условия транспортировки

Во время транспортировки **Vysis MYB SpectrumAqua FISH Probe Kit** транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Только для диагностического использования *In Vitro*.**

Vysis LSI MYB SpectrumAqua Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика
Необходимые материалы
- Зонды Vysis LSI MYB SpectrumAqua Probe
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов
1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºС.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°С для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°С на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºС минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºС.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Предполагаемые результаты

Ожидаемый сигнальный паттерн зонда Vysis LSI MYB SpectrumAqua (6q23) это два голубых сигнала. Другие сигнальные паттерны более чем с двумя голубыми сигналами, считаются атипичными сигнальными паттернами. Ожидаемый паттерн атипичной делеции зонда Vysis LSI MYB SpectrumAqua это один голубой сигнал. Могут встречаться другие атипичные паттерны сигналов и метафазный анализ может быть полезен в характеристике таких паттернов.

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4XSSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте время гибридизации. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2XSSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2XSSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2XSSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что значения pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многополосные фильтры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза) (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Обрабатывайте такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые температуру и временные промежутки в соответствии с методикой анализа из данной инструкции.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи герметика, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH–метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многопропускные фильтры дают меньше света, чем однопропускные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многопропускных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Qiu H, Xu W, Cao X, et al. Cytogenetic characterisation in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia: A prospective, multicenter study on 143 cases analysed with interphase fluorescence in situ hybridisation. *Leukemia & Lymphoma.* 2008;49 (10):1887-1892.
2. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;2(6):996-1006.
3. 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.
4. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
5. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
6. 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.
7. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.
Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

2010, 2020 Abbott. Все права защищены.

www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608278/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis AURKA SpectrumGold FISH Probe Kit

CE
en
REF 05N93-020

30-608484/R4

Vysis AURKA SpectrumGold
FISH Probe Kit
REF 05N93-020

30-608484/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-10°C / -30°C	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Биологический риск
	Опасность
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Зонд **Vysis AURKA SpectrumGOLD** для FISH-методики (набор реактивов) предназначен для выявления числа копий локуса Aurora Kinase A, локализованных в хромосоме 20, на участке 20q13.2 в образцах мочи человека.

Краткое описание и разъяснения

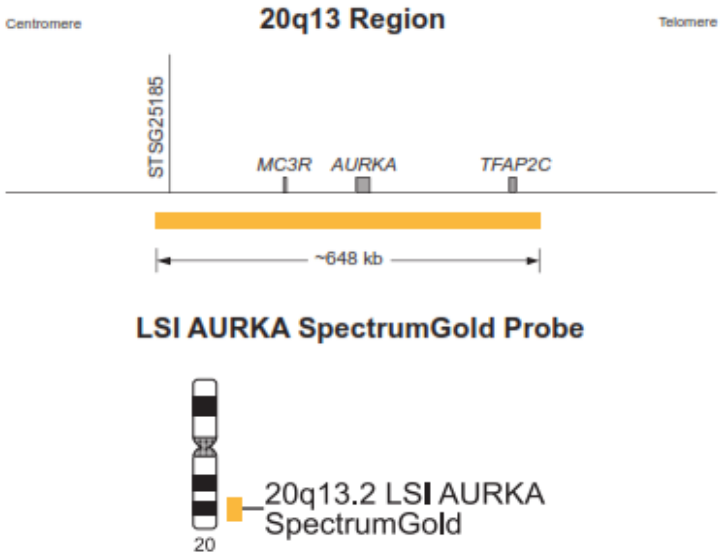
Анализ с использованием зонда **Vysis AURKA SpectrumGOLD** основан на определении изменений числа копий региона 20q13.2 с помощью теста FISH. Экспериментальные данные подтверждают, что значительное повышение или снижение уровня активности Aurora Kinase связано с генетической нестабильностью[1], и что высокий уровень экспрессии Aurora Kinase A часто ассоциируется с амплификацией региона хромосомы 20, кодирующего AURKA, указывающее на то, что нерегулируемая экспрессия по меньшей мере одного гена в амплифицируемом регионе обеспечивает преимущественную пролиферацию опухолевым клеткам и напрямую связана с неоплазией[2]. Показано также, что гиперэкспрессия гена Aurora Kinase A ассоциируется с анеуплоидией, хромосомной нестабильностью и активацией опухолегенной трансформации и прогрессией в клетках млекопитающих и при некоторых опухолях у человека, включая

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

уротелиальную карциному.[3,4] Амплификация AURKA показана при развитии рака молочной железы, толстого кишечника, головного мозга, мочевого пузыря, головы/ шеи и рака эндометрия, и экспрессия этого гена часто ассоциируется с генетической нестабильностью и неблагоприятным прогнозом[2]. Данные FISH, полученные на образцах мочи пациентов с раком мочевого пузыря показывают, что амплификация AURKA часто наблюдается при раке мочевого пузыря и может быть обнаружена в уротелиальных клетках.[5,6] Дальнейшая амплификация региона 20q ассоциируется с клинически агрессивными типами малигнизации, в том числе при раке мочевого пузыря[7].

Описание зонда

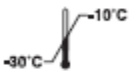
Зонд SpectrumGold AURKA размером приблизительно 650 кВ, охватывает весь ген AURKA размером 23 Kb на хромосоме 20 и прилегающие регионы, отходящие от центромерной области гена AURKA к теломерной части гена AURKA.



РЕАГЕНТЫ

1. Зонд Vysis AURKA SpectrumGOLD nge/CEP 17 SpectrumGreen (номер по каталогу 30-231035) (1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 100 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).
2. **Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804824)** (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

ХРАНЕНИЕ



Зонд **Vysis AURKA SpectrumGOLD** для FISH методики (набор реактивов) необходимо хранить при температуре -20ºC (± 10 ºC), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка набора **Vysis AURKA SpectrumGOLD** осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI AURKA SpectrumGold Probe

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[9], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[10], CLSI документ M29-A3[11], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[12].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[4]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[7]

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

- Не подвергайте образцы взаимодействию с кислотами, сильными основаниями и действию высоких температур. Такие взаимодействия как известно могут разрушить ДНК и привести к неправильному результату FISH –анализа.
- Несоблюдение всех процедур денатурации слайдов, гибридизации и детекции могут привести к неприемлимым или ошибочным результатам.
- Условия гибридизации могут негативно отображаться, если вы используете другие зонды, чем те, которые предлагает Abbott Molecular.
- Хранить реагенты необходимо до истечения их срока годности. На результаты могут негативно повлиять другие условия хранения, отличные от тех, что указаны на упаковке.
- Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Всегда проверяйте температуру растворов для предварительной обработки и промывочных буферов перед каждым использованием путем измерения температуры в сосудах Коплина, используя калибровочные термометры.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с вашими руководствами по безопасной утилизации.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

Растворы спиртов (70%, 85%, 100%), 1% Формальдегид
Раствор Протеазы и 20X SCC

Подготовьте согласно вкладышу внутри упаковки реагенты для проподготовки

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор (1000 мл)

- 20 мл 20X SSC pH 5.3
- 877 мл очищенной воды

Перемешайте тщательно. Измерьте pH при комнатной температуре, используя pH-метр. Доведите pH до 7.5±0,2 с помощью 1N NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Используйте фильтры с диаметром пор 0.45 мкм. Утилизируйте растворы в конце рабочего дня. Храните неиспользуемые растворы при 15-30°C в течении 6 месяцев.

Хранение LSI ДНК зонда: ДНК зонд LSI должен храниться при температуре не выше -20ºC, в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, Встряхните (vortex), затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Методика

Необходимые материалы

- Зонд **Vysis AURKA SpectrumGOLD** для FISH методики
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- DAPI II Конткраситель (30-804931)
- Реагенты для пробоподготовки (32-8011270)
- Гибридайзер Термобрайт
- Флуоресцентные микроскопы, снабженные соответствующими фильтрами
- Предметные стекла
- Покровные стекла
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- Полипропиленовые пробирки для микроцентрифуги (0.5 или 1.5 мкл)
- Таймер

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Микроцентрифуга
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Статическая или циркулирующая водяная баня (37±1°C)
- Циркулирующая водяная баня (73±1°C)
- Щипцы лабораторные
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (12×50 мл). Предполагаемый тип: Wheaton, номер 900570, для вертикальной окраски
- Калиброванный термометр
- Коробочка для слайдов к микроскопу с крышкой / или картонная папка для слайдов
- Иммерсионное масло для соответствующего мискроскопа
- Этанол (100%) Хранить при 15-30°C
- Очищенная вода
- Клей
- 10% нейтральный забуференный формалин
- NP-40

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH.

Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Процедура анализа

Соблюдайте меры предосторожности, указанные в упаковке перед взятием образцов для работы.

Сбор образцов и подготовка к анализу

Следующая процедура была разработана для цитологического анализа мочи. Следует избегать воздействия на образцы кислот, щелочей или высоких температур. Такие условия повреждают ДНК и могут привести к ошибочному результату FISH-анализа. Образцы следует собирать в фиксаторе на основе метанола и нанести на слайды.

Хранение образцов

Фиксированные клетками можно хранить при температуре -20°C (±10°C) до 10 дней и слайды могут храниться в течении года при температуре -20°C (±10°C).

Для достижения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температурах, указанных во вкладыше внутри упаковки.

Измерьте температуру растворов внутри сосудов Коплина, используя калибровочные термометры.

Подготовка слайдов

Примечание: Заполните сосуды Коплина подходящими растворами таким образом, чтобы все слайды были полностью погружены в сосуды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Налейте 2X SSC раствор в сосуд Коплина. Поместите сосуд на водяную баню и прогревайте до температуры 73±1°C. Проверьте температуру откалиброванными термометрами. Используйте в течении дня, затем утилизируйте.
2. Налейте раствор Протеазы 0,5 мл/мл в сосуд Коплина. Поместите сосуд Коплина на водяную баню и дайте прогреться до температуры 37±1°C. Проверьте температуру с помощью откалиброванных термометров. Используйте в течении дня, затем утилизируйте.
3. Налейте 1X PBS раствор в два сосуда Коплина, 1% формальдегид в сосуд Коплина, и 70% этанол, 85% этанол, и 100% этанол в три каждых сосуда Коплина соответственно.
4. Погрузите слайды в 2X SCC раствор при температуре 73±1°C на две минуты.
5. Переместите слайды в 0,5 мл/мл раствор Протеазы и инкубируйте при 37±1°C в течении 10 минут.
6. Достаньте слайды из раствора Протеазы и положите их на бумажное полотенце. Перенесите их в 1X PBS раствор и инкубируйте 5 минут при 15-30°C.
7. Зафиксируйте слайды поместив их в 1% формальдегид на 5 минут при 15-30°C.
8. Извлеките слайды из раствора 1% формальдегида и поместите слайды на бумажное полотенце. Переместите их в 1X PBS раствор и инкубируйте 5 минут при 15-30°C.
9. Извлеките слайды из 1X PBS раствора и помесите их на бумажное полотенце.

Подготовка Раствора зонда

1. Для каждой целевой области добавьте следующие компоненты в микроцентрифужную пробирку: 7 мкл LSI/WCP Гибридизационного буфера, 1 мкл пробы, и 2 мкл дистиллированной воды.
2. Перемешайте смесь зонда на вортексе. Быстро перевергите пробирку, чтобы весь раствор собрался на дне микропробирки и удалите образовавшиеся пузырьки воздуха.

Коденатурация и гибридизация пробы к таргентному участку

Гибридизер ThermoBrite используется для денатурации и гибридизации этапов анализа. Смотрите пользовательский мануал к прибору ThermoBrite для получения информации об использовании прибора.

1. Погрузите слайды в 70% этанол на 1 минуту.
2. Погрузите слайды в 85% этанол на 1 минуту.
3. Погрузите слайды в 100% этанол на 1 минуту.
4. Высушите слайды на воздухе.
5. Смочите карты влажности водой и вставьте в слоты внутри инструмента ThermoBrite.
6. Установите температуру денатурации (Melt Temp) 73°C и температуру денатурации (Melt Temp) 2 минуты. Установите температуру гибридизации (Hyb Temp) 39°C и время гибридизации (Hyb Time) минимально 16 часов и максимально 24 часа.
7. Нанесите 10 мкл (зависит от типа слайда) пробы на слайд и быстро накройте покровным стеклом. Повторите с другими слайдами.
8. Заклейте края покровного стекла резиновым клеем.
9. Поместите слайды в прибор ThermoBrite и начните программу гибридизации. Гибридизуйте слайды всю ночь или минимум 16 часов.
10. После окончания процедуры гибридизации, перейдите к процедуре отмывки слайдов.

Процедура отмывки слайдов

Подготовьте промывочные растворы:

- Заполните сосуды Коплина **0.4X SSC / 0,3% NP-40.** Поместите сосуды на водяную баню 73±1°C на 30 минут перед использованием. Используйте в течении дня, затем утилизируйте.
- Заполните сосуды Коплина **2X SSC/0,1.% NP-40.** Используйте при температуре 15-30°C. Используйте в течении дня, затем утилизируйте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание: для поддержания надлежащей температуры **0.4X SSC/0,3% NP-40 раствора,** промывайте все 4 слайда одновременно. Если вы используете менее 4 слайдов, добавьте пустые слайды при температуре 15-30°C, чтобы общее количество составило 4. Начните отсчет времени, когда 4 слайд будет погружен в сосуд.

1. Удалите клей и покровные стекла со слайдов.
2. Погрузите слайды в **0.4X SSC / 0,3% NP-40.** Перемешайте слайды в течении 1-3 секунд. Инкубируйте в течении 2 минут.

Примечание: Убедитесь, что что температура 0.4X SSC / 0,3% NP-40 раствора 73±1°C перед промывкой следующих четырех слайдов.

3. Переместите слайды в сосуды Коплина, содержащие 2X SSC/0.1% NP-40. Перемешайте слайды в течении 3-5 секунд. Инкубируйте в течении 1 минуты.

Визуализация Гибридизации

1. Высушите слайды на воздухе в темноте.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на таргетный участок и накройте покровным стеклом.
3. Просмотрите слайды с помощью соответствующего набора фильтров и объективов 40X или 63X на оптимально работающем флуоресцентном микроскопе. Следующие наборы оптических фильтров будут визуализировать флуорофоры, используемые в гибридизации:

Используемые фильтры Vysis	Одновременное возбуждение и эмиссия
DAPI	DAPI
Золотой	Флуорофор SpectrumGold

Хранение: Слайды необходимо хранить при температуре -20°C (±10°C) в защищенном от света месте и они должны быть проанализированы в течении 10 рабочих дней после гибридизации.

Процедура контроля качества

Оценка адекватности гибридизации слайдов

1. Морфология ядра: Границы опухолевых ядер, визуализируемые с помощью DAPI, должны быть хорошо различимы и ядра должны иметь хорошую целостность.
2. Фон: фон не должен содержать частиц, которые могут мешать подсчету.

Примечание: Флуоресцентная дымка или свечение могут быть хорошо заметными за пределами ядер, но это может быть приемлимо только до тех пор, пока флуоресцентная дымка/свечение не покрывает ядра и не затрудняет подсчет.

3. Интенсивность сигнала: сигнал должен быть ярким и четким и легко поддающимся подсчету. Сигнал должен быть компактным, круглым или овальным, следует избегать чрезмерно рассеянных сигналов.

Предполагаемые результаты

Ожидаемый сигнальный паттерн зонда AURKA для клеток с нормальным количеством повторов – два золотистых сигнала. Аномальное количество копий гена AURKA визуализируется золотистыми сигналами в количестве, большем двух. Не анализируйте ядра с количеством сигналов, меньшим, чем два.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[6]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1
Руководство по устранению неполадок

Проблема	Вероятная причина	Решение
Нет сигнала или слабый сигнал	Несоответствующий набор фильтров	Используйте рекомендованные фильтры
	Микроскоп не функционирует должным образом	Позвоните представителю по техническому обслуживанию микроскопа
	Неправильная лампа (Ксенон или Вольфрам)	Используйте ртутную лампу (100 Вт рекомендуемая)
	Ртутная лампа очень старая	Замените на новую лампу
	Ртутная лампа смещена	Настройте лампу
	Грязные/или поцарапаны линзы микроскопа	Очистите или замените линзу
	Грязное или разбитое зеркало в лампе	Почистите или замените зеркало
	Неправильные условия гибридизации	Проверьте температуру гибридизации и денатурации
	Неподходящая температура постгибридизационной отмывки	Увеличьте время гибридизации до 16 часов
		Проверить температуру водяной бани 73±1°C
	Пузырьки воздуха под покровным стеклом препятствуют проникновению зонда	Нанесите покровное стекло касаясь поверхности гибридизационной смеси
	Неадекватное расщепление протеазой	Проверьте температуру бани 37±1°C
		Проверьте pH буфера 2.0±0.2
		Увеличьте время действия протеазы до 20 мин.
	Потеря ДНК (плохое окрашивание конткрасителем DAPI)	Проверьте условия фиксации
	Неправильное хранение зондов	Храните зонды при -20°C (±10°C) в темноте
Низкая специфичность сигнала	Несоответствующие условия гибридизации	Проверьте температуру гибридизации и денатурации
	Низкая промывочная температура	Поддерживайте температуру промывки при 73±1°C
Фоновый шум	Неадекватные условия отмывки	Проверьте pH промывочного буфера
		Проверьте температуру бани 73±1°C
		Обеспечьте легкое перемешивание во время отмывки
Чрезмерно яркий сигнал	Концентрация пробы очень высока для вашего микроскопа	Попробуйте заблокировать сигнал, поместив фильтр нейтральной плотности по пути возбуждения
Ядерная структура не тронута	Чрезмерное действие фермента	Уменьшить время действия протеазы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Giet et al. (2005) Trends in Cell Biology 15: 241-50.
2. Gautschi et al. (2008) Clinical Cancer Research 14(6): 1639-1648.
3. Bischoff et al. (1998) EMBO J. 17 (11): 3052-3065.
4. Zhou et al. (1998) Nature Genetics 20 (2): 189-193.
5. Park et al. (2008) Journal of the National Cancer Institute 100: 1401-1411.
6. Sen et al. (2002) Journal of the National Cancer Institute 94(17): 1320-1329.
7. Knuutila et al. (1998) American Journal of Pathology 152 (5): 1107- 1123.
8. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.
9. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
10. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
12. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI AURKA SpectrumGold FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,491,224,приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, и 6, 607, 877, приписанного [1]Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

©2010, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608484/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis MET SpectrumRed FISH Probe Kit

en

REF 06N05-020

30-608483/R3

Vysis MET SpectrumRed
FISH Probe Kit
REF 06N05-020
30-608483/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-10°C -30°C	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

The Vysis MET SpectrumRed FISH Probe Kit предназначена для обнаружения количества 7q31.2 методом флуоресцентной гибридизации in situ в заключенных в парафин образцах ткани легкого.

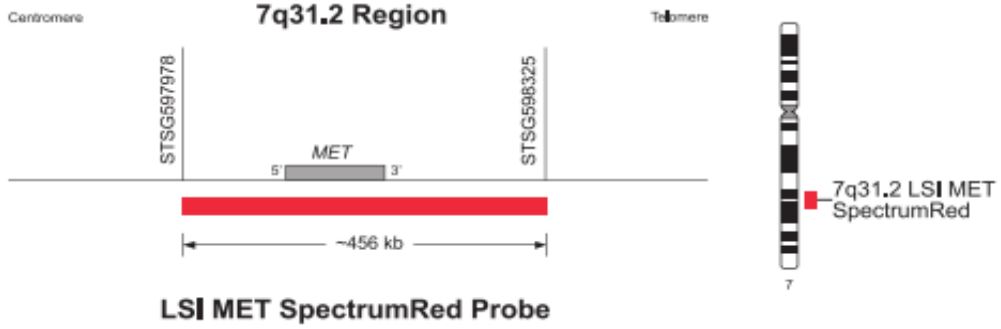
НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

The Vysis MET SpectrumRed FISH Probe Kit основан на способности локус специфической пробы MET идентифицировать изменение количества копий хромосомного локуса 7q31.2, используя метод FISH. Локус MET показал, с какой частотой происходит амплификация или гиперэкспрессия во многих злокачественных новообразованиях, включая рак почек, головного мозга, колоректального рака, рака желудка[1,2], рака легких, рака шеи, и амплификация связана с плохим клиническим прогнозом[1,2], подчеркивая важность сигналов гена MET в этих типах рака. Ген MET потенциально полезен для прогнозов по раку легкого[3,4], где FISH-позитивный статус предсказывает худшуювыживаемость у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ

Размером приблизительно 456 kb (chr7:115971431-116427460; март 2006, УСК Геномный браузер) SpectrumRed проба содержит почти весь ген MET на хромосоме 7.

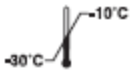


РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI MET SpectrumRed Probe (№30-231074) (пробирка, 20 мкл на пробирку). 200 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30804824) (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH7,0). Таблицы с Данными о Безопасности Материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

ХРАНЕНИЕ



Зонд **Vysis MET SpectrumRed** для FISH Probe Kit методики (набор реактивов) необходимо хранить при температуре -20ºC (± 10 ºC), в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Транспортировка набора **Vysis MET SpectrumRed** осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Обратитесь к инструкции ThermoBrite, Раздел «Опасность», инструкциям по технике безопасности.

Vysis LSI MET SpectrumRed Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[9], CLSI документ M29-A3[10], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[11].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[8]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[11]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

• Не подвергайте образцы взаимодействию с кислотами, сильными основаниями и действию высоких температур. Такие взаимодействия как известно могут разрушить ДНК и привести к неправильному результату FISH –анализа.
• Несоблюдение всех процедур денатурации слайдов, гибридизации и детекции могут привести к неприемлимым или ошибочным результатам.
• Условия гибридизации могут негативно отображаться, если вы используете другие зонды, чем те, которые предлагает Abbott Molecular.
• Хранить реагенты необходимо до истечения их срока годности. На результаты могут негативно повлиять другие условия хранения, отличные от тех, что указаны на упаковке.
• Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
• Всегда проверяйте температуру растворов для предварительной обработки и промывочных буферов перед каждым использованием путем измерения температуры в сосудах Коплина, используя калибровочные термометры.
• Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с вашими руководствами по безопасной утилизации.
• Процедура оптимизирована для использования с образцами ткани легкого, заключенного в парафин.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре (15-30°C) Встряхните (vortex), затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

СБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА АНАЛИЗА

Образцы ткани помещаются на положительно заряженные слайды с использованием стандартных методик. Для идентификации таргетных областей проводят окраску гематоксилином/эозином (H&E) на предметном стекле из серии 10 покрасок для каждого слайда. Для подготовки образцов, заключенных в парафин для метода FISH, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны, чтобы увеличить проницаемость тканей и провести гибридизацию с использованием стандартных процедур. Обратитесь к вкладышу внутри набора Vysis Paraffin Pretreatment Kit IV & Post Hybridization Wash Buffer Kit (№ 01N31-005).

Процедура

Необходимые материалы

Vysis MET SpectrumRed FISH Probe Kit

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- Paraffin Pretreatment Kit IV and Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No. 01N31-005)
- DAPI I Counterstain/Antifade (Part No. 30-804840, 30-804860, or 30-804960)

Лабораторные материалы

- ThermoBrite/инкубатор/духовка/плита (54°C до 68°C)
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендованными фильтрами
- Предварительно очищенные положительные слайды для микроскопа
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1 – 10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0,5 или 1,5 мкл)
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Градуированные цилиндры
- Статичная водяная баня и водяная баня с циркуляцией (37є±1 °C)
- Циркулирующая водяная баня (74 ±1°C и 80 ±2°C). Примечание:
- Статические водяные бани не обеспечивают адекватный температурный
- контроль для бань с высокой температурой.
- Очищенная водяная баня (40 to 45°C)
- Алмазный резец или стойкий к воздействию растворителей маркер
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (12 Ч 50 мл рекомендуемый тип: вертикальный сосуд)
- Калибровочные термометры
- Коробка слайдов для микроскопа с крышкой

Лабораторные реагенты

- Хемо Де или ксилен
- Гематоксилин и эозин
- Имерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре
- Очищенная вода
- Клей

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH. Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-п

Ороизводителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляноиммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75.

Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Гибридизация LSI MET SpectrumRed пробы к таргетному региону ДНК обозначается красным сигналом флуоресценции. Присутствие всех других участков ДНК будет флуоресцировать голубым сигналом как результат окрашивания контркрасителем DAPI I. Компания Эббот Молекуляр (Abbott Molecular) выпускает наборы фильтров с одной и двумя

полосами пропускания, которые оптимизированы для использования совместно с наборами ДНК-зондов LSI и подходят для большинства моделей флуоресцентных микроскопов. Рекомендуемые наборы фильтров для LSI MET SpectrumRed пробы это DAPI и красные одиночные фильтры.

Процедура анализа

Меры предосторожности

См. Раздел **«Меры предосторожности»** во вкладыше внутри упаковки перед подготовкой образцов.

Обработка образцов, заключенных в парафин

Следующая процедура была разработана для образцов ткани рака легкого, заключенного в парафин. Избегайте воздействия сильных оснований, кислот и высоких температур. Такие воздействия как известно могут привести к повреждению ДНК и неверному результату FISH-анализа.

Подготовка слайдов для образцов опухолевой ткани, заключенной в парафин

Внимание: Если только слайды, лучше чем образцы из блоков, лучше начинать процедуру с шага 5.

1. Отрезать 2 или более последовательных секций парафиновых срезов, 5±1 мкм, используя микротом.
2. Погрузите срезы на водяную баню 40 ± 2 ° C.
3. Установите срезы на положительно заряженные стекла.
4. Дайте слайдам высохнуть.
5. Обжигать слайды от 2 до 24 часов при температуре от 56±2 °C. Обжигание может проходить на ThermoBrite (или эквиваленте)/инкубатор/духовка/плита.

Внимание: если парафин с температурой плавления выше, увеличить температуру приблизительно до 68 °C.

6. Обрабатывайте слайды согласно процедуре ниже.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Прегибридизационная процедура
Данная процедура была оптимизирована для образцов опухолевой ткани, заключенной в парафиновые блоки. Для ткани легкого нужен Vysis Paraffin Pretreatment Kit IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No.01N31-005) для депарафинизации, обработки слайдов и процедуры обработки протеазой.

Приготовление смеси зондов:
1. Для каждой искомой области, добавьте следующее в микроцентрифужные пробирки: 7μL LSI/WCP гибридизационный буфер, 1μL пробы, 2μL очищенной воды.
Внимание: если одновременно гибридизуются три пробы, и каждая помечена разными флуорохромами, добавьте 1 мкл разной пробы. Добавьте очищенной воды, чтобы довести объем пробы до 3 мкл.
2. Центрифуга микропробирки от 1 до 3 секунд.
3. Отвортексировать и центрифугировать снова от 1 до 3 секунд.
4. Равновесная температура смеси зонда от 15 до 30 ° C.
5. Отвортексируйте смесь зондов и убедитесь, что растворы хорошо смешаны.

ПРОЦЕДУРА ГИБРИДИЗАЦИИ
ThermoBrite (или аналог) должна быть использована для денатурации и гибридизации. Обратитесь к Руководству ThermoBrite Оператор для получения инструкции по использованию прибора.
1. Погрузите слайды в 70% этаноле в течение 1 минуты.
2. Погрузите слайды в 85% этаноле в течение 1 минуты.
3. Погрузите слайды в 100% этаноле в течение 1 минуты.
4. Высушите слайды в течение от 2 до 5 минут.
5. Смочите карты влажность с водой и поставьте в гнездо для карт ThermoBrite. Убедитесь, что поверхность ThermoBrite чистая и на ней нет мусора.
6. Установите температуру денатурации до 73°C и время денатурации до 3 минут. Установите температуру гибридизации (Hyb Temp) до 37°C, и время гибридизации с 14 до 24 часов.
7. Нанесите 10 мкл зонда смеси на каждый слайд, и сразу же наложите покровное стекло. Убедитесь, пузырьки воздуха не присутствуют в смеси зонда перед нанесением покровного стекла.
8. Зафиксируйте покровное стекло с помощью резиновой клея.
9. Поместите слайды на ThermoBrite и начните программу гибридизации.
10. По окончании процедуры гибридизации (от 16 до 24 часов) перейти к процедуре отмывки слайдов.

Постгибридизационная процедура
Используется Vysis Paraffin Pretreatment Kit IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No. 01N31-005).
Внимание: Процедура промывки слайдов должна проводиться в тот день, когда гибридизация закончена.

Визуализация гибридизованных слайдов.
1. Высушите слайды в темноте.
2. Нанесите 10 мкл контркрасителя DAPI I на таргетную область и покройте покровным стеклом. Храните слайды в темноте.
3. Храните слайды при температуре от -20°C (±10°C). Если подсчет не будет происходить в течении 4 часов после окончания шага 2 слайды могут храниться до 10 дней.

Ожидаемые результаты
В ядрах с нормальным количеством копий гена MET визуализируются 2 красных сигнала. Абнормальное количество копий гена MET показывает более чем две копии красного сигнала.
Обратите внимание, что при нарезке образца, залитого в парафин, происходит усечение ядер, в результате чего некоторые ядра кажутся содержащими меньше сигналов, чем было на самом деле

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

до приготовления срезов. Например, некоторые нормальные ядра будут содержать менее 2 сигналов MET из-за усечения ядер.

Ограничения использования

Интерпритация результатов FISH должна производиться с использованием соответствующих контрольных и аналитических методов, а также принимая во внимание другие клинические и диагностические исследования[6,7].

Каждая лаборатория должна установить аналитические нормы для паттернов абнормальных сигналов, представляющих интерес.

Устранение неполадок

При просмотре результатов FISH убедитесь, что все настройки микроскопа оптимальны. В таблице ниже приведены причины, к которым могут привести использование проб LSI. А также возможные причины и предложения по повышению производительности анализа.

Таблица 1

Инструкция по устранению проблем

Проблема	Возможная причина	Решение
• Отсутствие сигнала или слабый сигнал	• Неподходящий набор фильтров • Нарушение работы микроскопа • Неподходящие лампы (т.е. ксеноновые или вольфрамовые) • Просроченная ртутная лампа • Смещение ртутной лампы • Грязные и/или потрескавшиеся собирательные линзы • Грязное или разбитое зеркало • Неподходящие условия гибридизации • Неподходящая температура промывочных растворов после гибридизации • Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, и зонд не достиг места назначения • Недостаточное количество гибридизационного раствора для среза • Неправильная обработка протеазой • Длительная фиксация среза (разъединение клеток) • Потеря ДНК (плохая окраска DAPI)	• Используйте рекомендуемые фильтры • Свяжитесь с техническим представителем компании производителем микроскопа • Используйте ртутную лампу (желательно, 100 Вт) • Замените старую лампу на новую • Выровняйте лампу • Протрите и замените линзы • Протрите или замените зеркало • Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37 ± 1ºC • Увеличьте продолжительность гибридизации (не менее 14 ч) • Убедитесь в том, что температура водяной бани составляет 73 - 75ºC • Уменьшите температуру промывочного раствора до 73ºC • Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда • Увеличьте количество гибридизационного раствора до 20 мкл на один срез • Убедитесь в том, что температура водяной бани составляет 37 ± 1ºC • Убедитесь в том, что pH буферного раствора составляет 1.0 ± 0.2 • Увеличьте продолжительность обработки протеазой с прибавкой по 5 минут. • Оптимальное время фиксации микропрепаратов, залитых парафином, составляет 1 – 2 суток. Более длительная фиксация приводит к прогрессирующему уменьшению интенсивности сигнала. • Соблюдайте условия фиксации.
• Изменение интенсивности	• Вариант нормы	• Если проблемные зоны хорошо окрашены DAPI, микропрепарат

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сигнала в срезе	• Из-за попадания пузырьков воздуха под покровное стекло зонд распределен по микропрепарату неравномерно • Слишком большой срез	можно использовать для подсчета ядер. • Повторите гибридизацию на следующем смежном срезе или на том же микропрепарате и убедитесь в том, что под покровное стекло не попали пузырьки воздуха. • Для больших срезов увеличьте объем гибридизационного раствора до20 мкл.
• Фоновые помехи	• Несоблюдение условий промывания	• Убедитесь в том, что pH промывочных растворов I и II составляет 7.0 – 7.5, в противном случае, утилизируйте раствор. • Убедитесь в том, что температура промывочного раствора составляет 73 - 75ºC • Во время промывания перемешивайте растворы • Увеличьте температуру промывочного раствора до 75ºC • Увеличьте продолжительность промывания до 5 минут
• Потеря ткани или нарушение ее морфологии	• Длительная фиксация среза (плохое окрашивание DAPI) • Неподходящие микропрепараты • Неправильная сушка микропрепаратов • Чрезмерная предварительная обработка • Чрезмерная денатурация • При удалении покровного стекла после гибридизации произошло повреждение среза ткани	• Убедитесь в соблюдении продолжительности и условий фиксации ткани • Используйте положительно заряженные предметные стекла • Убедитесь в том, что температура воздушного термостата составляет 56ºC • Убедитесь в том, что температура раствора для предварительной обработки составляет 80 ± 1°C • Уменьшите продолжительность предварительной обработки • Уменьшите продолжительность обработки протеазой • Уменьшите продолжительность денатурации • В буферном растворе покровное стекло должно отсоединиться

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Liu X, Newton RC, Scherle PA. Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges. *Trends Mol Med.* 2010;16(1):37-45.

2. Kubo T, Yamamoto H, Lockwood WW, et al. MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer.* 2009 Apr 15;124(8):1778-84.

3. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non– small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 2009;27(10):1667-74.

4. Okuda K, Sasaki H, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2008 Nov;99(11):2280-5.

5. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.

6. Dewald GW. In: Fan SY, ed. Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2002;204:311-42.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med.* 2006;8(1):16-23.
8. US Department of Health and Human Services. Biosafety inMicrobiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline –Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
11. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Адрес Авторизованного Представителя
Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Висбаден, Германия
T. +49-6122-580

Vysis LSI MET SpectrumRed FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,491,224,приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, и 6, 607, 877, приписанного [1]Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

©2010, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608483/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit

en

REF 06N10-020

30-608481/R3

Vysis PIK3CA SpectrumGreen
FISH Probe Kit
REF 06N10-020
30-608481/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Биологический риск
	Опасность
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

Международное обслуживание клиентов: позвоните в Ваше представительство Abbott.

Упаковка содержит инструкцию, которую нужно внимательно прочитать перед использованием. Достоверность результатов исследования не может быть гарантирована, если анализ проводился с какими-либо отклонениями от инструкции.

НАЗНАЧЕНИЕ

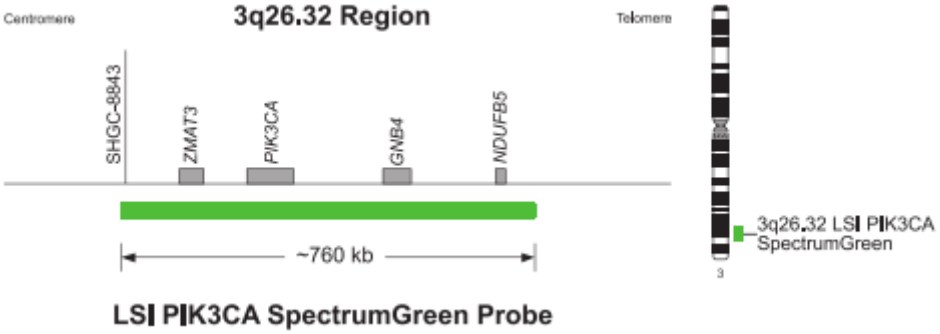
Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit предназначен для детекции количества копий 3q26.32 методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в заключенной в парафине опухолевой ткани рака легкого.

Краткое описание и разъяснения

Локализация гена PIK3CA показала, что данный ген достаточно часто амплифицируется в различных видах рака, включая рак легкого, яичников, шейки матки, желудка, колоректального рака, головы и шеи и других различных видах рака.[1-3] Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit предназначена для FISH-анализа, Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit идентифицирует количество измененных копий на хромосоме 3q26.32.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ
PIK3CA проба содержит SpectrumGreen и охватывает примерно 760 кб, которая включает весь ген PIK3CA на хромосоме 3, регион 26.32.



РЕАГЕНТЫ
1. **Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen Probe (**Part No. 30-231075) (пробирка, 20 мкл на пробирку). 200 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).
2. **Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30804824)** (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

Хранение

Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit должна храниться при температуре -20 °C (±5°C). Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit должна храниться в защищенном от света месте.

Условия транспортировки
Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании AbbottMolecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**
Использовать только для in vitro диагностики.
Обратитесь к инструкции ThermoBrite, Раздел «Опасность», инструкциям по технике безопасности.
Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в *руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях*[4], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[5], CLSI документ M29-A3[6], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[7].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[4]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[7]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

The Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit предназначена только для использования с образцами, которые обработаны и хранятся в соответствии с инструкцией, находящейся внутри набора.

- Не используйте наборы и реагенты по истечению срока годности, указанной на упаковке.
- Следуйте инструкции. Несоблюдение инструкции может привести к ошибочным результатам.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не подвергайте образцы взаимодействию с кислотами, сильными основаниями и действию высоких температур. Такие взаимодействия как известно могут разрушить ДНК и привести к неправильному результату FISH –анализа.
- Несоблюдение всех процедур денатурации слайдов, гибридизации и детекции могут привести к неприемлимым или ошибочным результатам.
- Условия гибридизации могут негативно отображаться, если вы используете другие зонды, чем те, которые предлагает Abbott Molecular.
- Хранить реагенты необходимо до истечения их срока годности. На результаты могут негативно повлиять другие условия хранения, отличные от тех, что указаны на упаковке.
- Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
- Всегда проверяйте температуру растворов для предварительной обработки и промывочных буферов перед каждым использованием путем измерения температуры в сосудах Коплина, используя калибровочные термометры.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с вашими руководствами по безопасной утилизации.
- Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit содержит формамид, который является тератогеном. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Процедура оптимизирована для образцов тканей легкого, заключенного в парафин.
- Перед использованием оставить реагенты при комнатной температуре (от 15 до 30°C), отцентрифугируйте каждую пробирку в течении 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Процедура
Необходимые материалы
Vysis PIK3CA SpectrumGreen FISH Probe Kit (06N10-020)

Необходимые, но не входящие в комплект материалы
- Paraffin Pretreatment Kit IV and Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No. 01N31-005)
- DAPI I Counterstain/Antifade (Part No. 06J49-001)

Лабораторные материалы
- ThermoBrite с полосками влажности
- Воздушный инкубатор/печь (37 до 73°C)
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендованными фильтрами
- Предварительно очищенные положительные слайды для микроскопа
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1 – 10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0,5 или 1,5 мкл)
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Градуированные цилиндры
- Статичная водяная баня и водяная баня с циркуляцией (37є±1 °C)
- Циркулирующая водяная баня (74 ±1°C и 80 ±2°C). Примечание:
- Статические водяные бани не обеспечивают адекватный температурный
- контроль для бань с высокой температурой.
- Очищенная водяная баня (40 to 45°C)
- Алмазный резец или стойкий к воздействию растворителей маркер
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (12 Ч 50 мл рекомендуемый тип: вертикальный сосуд)
- Калибровочные термометры
- Коробка слайдов для микроскопа с крышкой

Лабораторные реагенты
- Хемо Де или ксилен
- Гематоксилин и эозин
- Имерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре
- Очищенная вода
- Клей

Микроскоп и дополнительные устройства
Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH. Рекомендуется периодически приглашать представителя технического

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

отдела фирмы-производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.
Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.
Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.
Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляноиммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.
Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.
Фильтры: Гибридизация LSI PIK3CA SpectrumGreen пробы к таргетному региону ДНК обозначается зеленым сигналом флуоресценции. Присутствие всех других участков ДНК будет флуоресцировать голубым сигналом как результат окрашивания контркрасителем DAPI I. Компания Эббот Молекуляр (Abbott Molecular) выпускает наборы фильтров с одной и двумя полосами пропускания, которые оптимизированы для использования совместно с наборами ДНК-зондов LSI и подходят для большинства моделей флуоресцентных микроскопов. Рекомендуемые наборы фильтров для Vysis PIK3CA SpectrumGreen пробы это DAPI и зеленые одиночные фильтры.

Процедура анализа

Меры предосторожности
См. Раздел **«Меры предосторожности»** во вкладыше внутри упаковки перед подготовкой образцов.

Процедура подготовки образцов, заключенных в парафиновые блоки
Следующая процедура была использована для образцов опухолевой ткани легкого, заключенных в парафин.

Подготовка слайдов ткани рака легкого, заключенного в парафин
Внимание: Если только слайды, лучше чем образцы из блоков, лучше начинать процедуру с шага 5.
Для идентификации таргетных областей проводят окраску гематоксилином/эозином (H&E) на предметном стекле из серии 10 покрасок для каждого слайда.
1. Отрезать 2 или более последовательных секций парафиновых срезов, 4-6 мкм, используя микротом.
2. Погрузите срезы на водяную баню 40-45°C.
3. Установите срезы на положительно заряженные стекла.
4. Дайте слайдам высохнуть.
5. Обжигать слайды от 2 до 24 часов при температуре от 56±2°C. Обжигание может проходить на ThermoBrite (или эквиваленте)/инкубатор/духовка/плита.
Внимание: если парафин с температурой плавления выше, увеличить температуру приблизительно до 68 °C.
7. Обрабатывайте слайды согласно процедуре ниже.

Прегибридизационная процедура
Данная процедура была оптимизирована для образцов опухолевой ткани, заключенной в парафиновые блоки. Для ткани легкого нужен Vysis Paraffin Pretreatment Kit IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No.01N31-005) для депарафинизации, обработки слайдов и процедуры обработки протеазой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление смеси зондов:
1. Для каждой искомой области, добавьте следующее в микроцентрифужные пробирки: 7µL LSI/WCP гибридизационный буфер, 1µL пробы, 2µL очищенной воды.
Внимание: если одновременно гибридизуются три пробы, и каждая помечена разными флуорохромами, добавьте 1 мкл разной пробы. Добавьте очищенной воды, чтобы довести объем пробы до 3 мкл.
2. Центрифуга микропробирки от 1 до 3 секунд.
3. Отвортексировать и центрифугировать снова от 1 до 3 секунд.
4. Равновесная температура смеси зонда от 15 до 30 ° C.
5. Отвортексируйте смесь зондов и убедитесь, что растворы хорошо смешаны.

ПРОЦЕДУРА ГИБРИДИЗАЦИИ
ThermoBrite (или аналог) должна быть использована для денатурации и гибридизации. Обратитесь к Руководству ThermoBrite Оператор для получения инструкции по использованию прибора.
1. Погрузите слайды в 70% этаноле в течение 1 минуты.
2. Погрузите слайды в 85% этаноле в течение 1 минуты.
3. Погрузите слайды в 100% этаноле в течение 1 минуты.
4. Высушите слайды в течение от 2 до 5 минут.
5. Смочите карты влажность с водой и поставьте в гнездо для карт ThermoBrite. Убедитесь, что поверхность ThermoBrite чистая и на ней нет мусора.
6. Установите температуру денатурации до 73°C и время денатурации до 3 минут. Установите температуру гибридизации (Hyb Temp) до 37°C, и время гибридизации с 14 до 24 часов.
7. Поместите слайды в прибор ThermoBrite.
8. Нанесите 10 мкл зонда смеси на каждый слайд, и сразу же наложите покровное стекло. Убедитесь, пузырьки воздуха не присутствуют в смеси зонда перед нанесением покровного стекла.
9. Зафиксируйте покровное стекло с помощью резиновой клея.
10. Поместите слайды на ThermoBrite и начните программу гибридизации.
11. По окончании процедуры гибридизации (от 16 до 24 часов) перейти к процедуре отмывки слайдов.

Постгибридизационная процедура
Используется Vysis Paraffin Pretreatment Kit IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No. 01N31-005).

Визуализация гибридизованных слайдов.
1. Высушите слайды в темноте.
2. Нанесите 10 мкл контркрасителя DAPI I на таргетную область и покройте покровным стеклом. Храните слайды в темноте.
3. Храните слайды при температуре от -20°C (±10°C). Если подсчет не будет происходить в течении 4 часов после окончания шага 2 слайды могут храниться до 10 дней.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
В ядре с нормальным числом гена PIK3CA отмечается два зеленых сигнала. Атипичное число копий гена PIK3CA указывает на наличие двух копий зеленого сигнала. Обратите внимание, что при нарезке образца, залитого в парафин, происходит усечение ядер, в результате чего некоторые ядра кажутся содержащими меньше сигналов, чем было на самом деле до приготовления срезов. Например, некоторые нормальные ядра будут содержать менее 2 сигналов PIK3CA из-за усечения ядер.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Аналитическая метафазная чувствительность и специфичность
Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов, которые гибридизуются с правильным локусом и никаким другим местом. Аналитическая чувствительность определяется как процент хромосомных мишеней с ожидаемым паттерном сигналов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Аналитическая специфичность Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen Probe для соответствующего целевого локуса хромосомы была установлена с использованием метафазных хромосом, полученных из культур периферической крови 5 кариотипически нормальных донорских образцов. Локализация гибридизации каждого сигнала FISH на хромосомах 20 последовательных метафазных ядер от каждого из 5 образцов была оценена в общей сложности для 200 целевых локусов. Было просчитано число FISH сигналов метафазных хромосом, гибридизованных с правильными локусами.

Специфичность Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen Probe рассчитывается как количество FISH сигналов метафазной хромосомы, гибридизованной с правильным локусом (3q26.32) разделенной на общее количество гибридизованных метафазных хромосомных сигналов и умноженное на 100%. Аналитическая специфичность Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen Probe была 100%, как показано в Таблице 1.

Аналитическая чувствительность Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen Probe расчитывается как количество FISH сигналов метафазных хромосом, гибридизованных с правильным локусом (3q26.32), разделенное на 200 таргетных локусов и умноженное на 100%. Аналитическая чувствительность Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen Probe была 100%, как показано в Таблице 1.

Таблица 1. Аналитическая метафазная чувствительность и специфичность для зонда Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen

Истинно-Положительный сигнал/Всего	Чувствительность		Ложно-положительные сигналы/Всего	Специфичность	
	Чувствительность	95% Cl		Специфичность	95% Cl
200/200	100%	(98,100)	0/100	100%	(96,100)

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Производительность оценивалась тестированием воспроизводимости зонда Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen на двух линиях опухолевых клеток. Клеточные линии были выбраны для представления отрицательного и положительного образцов, на основе ранее определенного количества диплоидных и анеуплоидных сигналов для зонда Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen соответственно. Оценивалось три повторяющихся слайда каждой клеточной линии двумя исследователями в течении 5 дней, всего 30 подсчетов на каждую клеточную линию. Перечисление сигналов включает в себя подсчет FISH сигналов LSI PIK3CA в 50 клетках на слайд и определение среднего количества сигналов.

В ядре с диплоидными генами PIK3CA ожидаемый нормальный паттерн сигналов для зонда Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen это два зеленых сигнала. Ожидаемый паттерн сигнала для зонда Vysis LSI PIK3CA SpectrumGreen на клеточной линии с анеуплоидными генами это больше чем две копии зеленого сигнала.

Коэффициент вариации воспроизводимости от наблюдателя к наблюдателю в подсчете диполидных сигналов (отрицательное, среднее значение ≤2 сигналов на клетку), паттерн сигналов составляет 1.6% для среднего количества сигналов и анеуплоидный (положительный, среднее значение >2 сигналов) паттерн сигналов составляет 5,2%.

Результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2 Прецизионный анализ Воспроизводимости

Образец	Количество подсчитываемых слайдов[a]	Число сигналов на клетку[b]	%CV			
			В течении дня (элементы)	Между днями (элементы)	Между наблюдателями	Всего (между наблюдателями)
Положительный	30	**1.87**	**0.7**	**1.4**	**0.0**	**1.6**
Отрицательный	30	**4.24**	**4.9**	**0.0**	**1.5**	**5.2**

[a] Для каждого образца было изучено три повторяющихся предметных стекла 2 наблюдателями в течении 5 дней для 30 подсчетов.

[b] на предметном стекле исследовали 50 клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ограничения использования

Интерпритация результатов FISH должна производиться с использованием соответствующих контрольных и аналитических методов, а также принимая во внимание другие клинические и диагностические исследования[8].

Каждая лаборатория должна установить аналитические нормы для паттернов абнормальных сигналов, представляющих интерес.

Устранение неполадок

При просмотре результатов FISH убедитесь, что все настройки микроскопа оптимальны. В таблице ниже приведены причины, к которым могут привести использование проб LSI. А также возможные причины и предложения по повышению производительности анализа.

Таблица 1

Инструкция по устранению проблем

Проблема	Возможная причина	Решение
• Отсутствие сигнала или слабый сигнал	• Неподходящий набор фильтров • Нарушение работы микроскопа • Неподходящие лампы (т.е. ксеноновые или вольфрамовые) • Просроченная ртутная лампа • Смещение ртутной лампы • Грязные и/или потрескавшиеся собирательные линзы • Грязное или разбитое зеркало • Неподходящие условия гибридизации • Неподходящая температура промывочных растворов после гибридизации • Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, и зонд не достиг места назначения • Недостаточное количество гибридизационного раствора для среза • Неправильная обработка протеазой • Длительная фиксация среза (разъединение клеток) • Потеря ДНК (плохая окраска DAPI)	• Используйте рекомендуемые фильтры • Свяжитесь с техническим представителем компании производителем микроскопа • Используйте ртутную лампу (желательно, 100 Вт) • Замените старую лампу на новую • Выровняйте лампу • Протрите и замените линзы • Протрите или замените зеркало • Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37 ± 1ºC • Увеличьте продолжительность гибридизации (не менее 14 ч) • Убедитесь в том, что температура водяной бани составляет 73 - 75ºC • Уменьшите температуру промывочного раствора до 73ºC • Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда • Увеличьте количество гибридизационного раствора до 20 мкл на один срез • Убедитесь в том, что температура водяной бани составляет 37 ± 1ºC • Убедитесь в том, что pH буферного раствора составляет 1.0 ± 0.2 • Увеличьте продолжительность обработки протеазой с прибавкой по 5 минут. • Оптимальное время фиксации микропрепаратов, залитых парафином, составляет 1 – 2 суток. Более длительная фиксация приводит к прогрессирующему уменьшению интенсивности сигнала. • Соблюдайте условия фиксации.
• Изменение интенсивности	• Вариант нормы	• Если проблемные зоны хорошо окрашены DAPI, микропрепарат

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сигнала в срезе	• Из-за попадания пузырьков воздуха под покровное стекло зонд распределен по микропрепарату неравномерно • Слишком большой срез	можно использовать для подсчета ядер. • Повторите гибридизацию на следующем смежном срезе или на том же микропрепарате и убедитесь в том, что под покровное стекло не попали пузырьки воздуха. • Для больших срезов увеличьте объем гибридизационного раствора до20 мкл.
• Фоновые помехи	• Несоблюдение условий промывания	• Убедитесь в том, что pH промывочных растворов I и II составляет 7.0 – 7.5, в противном случае, утилизируйте раствор. • Убедитесь в том, что температура промывочного раствора составляет 73 - 75ºC • Во время промывания перемешивайте растворы • Увеличьте температуру промывочного раствора до 75ºC • Увеличьте продолжительность промывания до 5 минут
• Потеря ткани или нарушение ее морфологии	• Длительная фиксация среза (плохое окрашивание DAPI) • Неподходящие микропрепараты • Неправильная сушка микропрепаратов • Чрезмерная предварительная обработка • Чрезмерная денатурация • При удалении покровного стекла после гибридизации произошло повреждение среза ткани	• Убедитесь в соблюдении продолжительности и условий фиксации ткани • Используйте положительно заряженные предметные стекла • Убедитесь в том, что температура воздушного термостата составляет 56ºC • Убедитесь в том, что температура раствора для предварительной обработки составляет 80 ± 1ºC • Уменьшите продолжительность предварительной обработки • Уменьшите продолжительность обработки протеазой • Уменьшите продолжительность денатурации • В буферном растворе покровное стекло должно отсоединиться

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Angulo B, Suarez-Gauthier A, Lopez-Rios F, et al. Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J Pathol.* 2008;214(3):347–356.

2. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet.* 1999;21(1):99–102.

3. Psyrri A, Papageorgiou S, Liakata E, et al. Phosphatidylinositol 3′-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(18):5724–5732.

4. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]

5. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
7. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
8. 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.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI PIC3CA SpectrumGreen Probe и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5, 491, 224 , приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 595, 479, 7, 115, 709, и 5, 756, 696 и 6, 607, 877, приписанного [1]Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы скрининга с 3q26 пробами защищены американскими патентами 6, 277, 563, приписанного [2]Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co, KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

©2012, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608481/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis BRAF SpectrumGold FISH Probe Kit

en

REF 06N09-020

30-608482/R3

Vysis BRAF SpectrumGold
FISH Probe Kit
REF 06N09-020
30-608482/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Vysis BRAF SpectrumGold FISH Probe предназначена для детекции количества копий 7q34 методом флуоресцентной гибридизации in situ в заключенных в парафин образцах ткани легкого.

Назначение теста

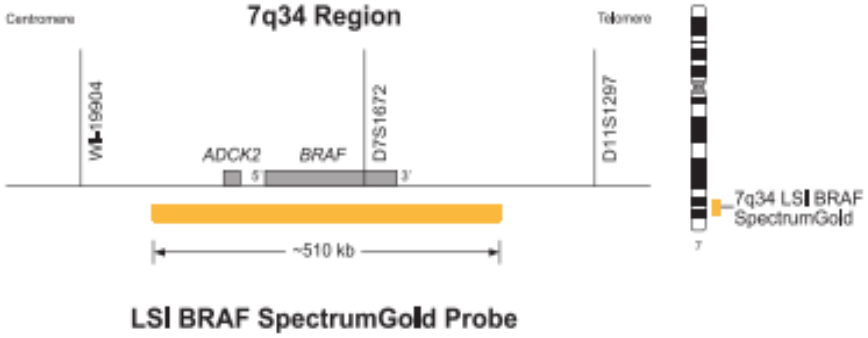
The Vysis BRAF FISH основан на способности локус специфической пробы BRAF идентифицировать изменение количества копий хромосомного локуса 7q34, используя метод FISH. BRAF один из трех серин/треонин RAF-регуляторных киназ, тех, что играют важную роль в клеточной пролиферации, дифференцировке и программируемой клеточной гибели. Он также является участником RAS-RAF-MEK-ERK-BRAF в инициировании туморогенезиса (злокачественной трансформации киназы BRAFs)[1]. Мутационноактивированный BRAF-V600E детектирован при меланоме (70%), колоректальном раке (15%), раке щитовидной железы (40%), раке яичников (30%) и немелкоклеточном раке легкого (3%).[2,3]

Меланома с активированной BRAF мутацией вероятно имеет увеличенное число копий в локусе BRAF[4]. Увеличенное количество копий BRAF было идентифицировано и при фолликулярном раке щитовидной железы и при злокачественной меланоме и происходит также через амплификацию гена или полисомию хромосомы 7[5,6,7]. Увеличенное количество копий гена BRAF ожидается и при раке легкого, где хромосома 7 также амплифицируется.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание пробы

Размером приблизительно 510 kb (chr7:139912659-140422776; март 2006, УСК Геномный браузер LSI BRAF (7q34) SpectrumGold проба содержит полный ген BRAF на хромосоме 7.



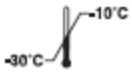
Реагенты

1. Vysis LSI BRAF SpectrumGold FISH Probe (Part# 30-231076) (пробирка, 20 мкл на пробирку). 200 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонди блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30804824) (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC(Ph 7,0).

Таблицы с Данными о Безопасности Материалов (MSDS) всехпредоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

ХРАНЕНИЕ



Vysis BRAF SpectrumGold FISH Probe необходимо хранить при температуре -20°C (±10°C), в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Транспортировка набора **Vysis BRAF SpectrumGold** осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Обратитесь к инструкции ThermoBrite, Раздел «Опасность», инструкциям по технике безопасности.

Vysis LSI BRAF SpectrumGold

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[11], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[12], CLSI документ M29-A3[13], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[14].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[11]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[14]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

• Не подвергайте образцы взаимодействию с кислотами, сильными основаниями и действию высоких температур. Такие взаимодействия как известно могут разрушить ДНК и привести к неправильному результату FISH –анализа.
• Несоблюдение всех процедур денатурации слайдов, гибридизации и детекции могут привести к неприемлимым или ошибочным результатам.
• Условия гибридизации могут негативно отображаться, если вы используете другие зонды, чем те, которые предлагает Abbott Molecular.
• Хранить реагенты необходимо до истечения их срока годности. На результаты могут негативно повлиять другие условия хранения, отличные от тех, что указаны на упаковке.
• Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
• Всегда проверяйте температуру растворов для предварительной обработки и промывочных буферов перед каждым использованием путем измерения температуры в сосудах Коплина, используя калибровочные термометры.
• Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с вашими руководствами по безопасной утилизации.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требующие свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре (15-30°C) Встряхните (vortex), затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

СБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА АНАЛИЗА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образцы ткани помещаются на положительно заряженные слайды с использованием стандартных методик. Для идентификации таргетных областей проводят окраску гематоксилином/эозином (H&E) на предметном стекле из серии 10 покрасок для каждого слайда. Для подготовки образцов, заключенных в парафин для метода FISH, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны, чтобы увеличить проницаемость тканей и провести гибридизацию с использованием стандартных процедур. Обратитесь к вкладышу внутри набора Vysis Paraffin Pretreatment Kit IV & Post Hybridization Wash Buffer Kit (№ 01N31-005).

Процедура
Необходимые материалы
Vysis BRAF SpectrumGold FISH Probe

Необходимые, но не входящие в комплект материалы
- Paraffin Pretreatment Kit IV and Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No. 01N31-005)
- DAPI I Counterstain/Antifade (Part No. 30-804840, 30-804860, or 30-804960)

Лабораторные материалы
- ThermoBrite/инкубатор/духовка/плита (54°C до 68°C)
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендованными фильтрами
- Предварительно очищенные положительные слайды для микроскопа
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1 – 10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0,5 или 1,5 мкл)
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Градуированные цилиндры
- Статичная водяная баня и водяная баня с циркуляцией (37є±1 °C)
- Циркулирующая водяная баня (74 ±1°C и 80 ±2°C). Примечание:
- Статические водяные бани не обеспечивают адекватный температурный
- контроль для бань с высокой температурой.
- Очищенная водяная баня (40 to 45°C)
- Алмазный резец или стойкий к воздействию растворителей маркер
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (12 Ч 50 мл рекомендуемый тип: вертикальный сосуд)
- Калибровочные термометры
- Коробка слайдов для микроскопа с крышкой

Лабораторные реагенты
- Хемо Де или ксилен
- Гематоксилин и эозин
- Имерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре
- Очищенная вода
- Клей

Микроскоп и дополнительные устройства
Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH. Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-п

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ороизводителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляноиммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75.

Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Гибридизация LSI MET SpectrumRed пробы к таргетному региону ДНК обозначается красным сигналом флуоресценции. Присутствие всех других участков ДНК будет флуоресцировать голубым сигналом как результат окрашивания контркрасителем DAPI I. Компания Эббот Молекуляр (Abbott Molecular) выпускает наборы фильтров с одной и двумя
полосами пропускания, которые оптимизированы для использования совместно с наборами ДНК-зондов LSI и подходят для большинства моделей флуоресцентных микроскопов. Рекомендуемые наборы фильтров для LSI MET SpectrumRed пробы это DAPI и красные одиночные фильтры.

Процедура анализа

Меры предосторожности

См. Раздел **«Меры предосторожности»** во вкладыше внутри упаковки перед подготовкой образцов.

Обработка образцов, заключенных в парафин

Следующая процедура была разработана для образцов ткани рака легкого, заключенного в парафин. Избегайте воздействия сильных оснований, кислот и высоких температур. Такие воздействия как известно могут привести к повреждению ДНК и неверному результату FISH-анализа.

Подготовка слайдов для образцов опухолевой ткани, заключенной в парафин

Внимание: Если только слайды, лучше чем образцы из блоков, лучше начинать процедуру с шага 5.

1. Отрезать 2 или более последовательных секций парафиновых срезов, 5±1 мкм, используя микротом.
2. Погрузите срезы на водяную баню 40 ± 2 ° C.
3. Установите срезы на положительно заряженные стекла.
4. Дайте слайдам высохнуть.
5. Обжигать слайды от 2 до 24 часов при температуре от 56±2 °C. Обжигание может проходить на ThermoBrite (или эквиваленте)/инкубатор/духовка/плита.

Внимание: если парафин с температурой плавления выше, увеличить температуру приблизительно до 68 °C.

6. Обрабатывайте слайды согласно процедуре ниже.

Прегибридизационная процедура

Данная процедура была оптимизирована для образцов опухолевой ткани, заключенной в парафиновые блоки. Для ткани легкого нужен Vysis Paraffin Pretreatment Kit IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No.01N31-005) для депарафинизации, обработки слайдов и процедуры обработки протеазой.

Приготовление смеси зондов:

1. Для каждой искомой области, добавьте следующее в микроцентрифужные пробирки: 7µL LSI/WCP гибридизационный буфер, 1µL пробы, 2µL очищенной воды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: если одновременно гибридизуются три пробы, и каждая помечена разными флуорохромами, добавьте 1 мкл разной пробы. Добавьте очищенной воды, чтобы довести объем пробы до 3 мкл.
2. Центрифуга микропробирки от 1 до 3 секунд.
3. Отвортексировать и центрифугировать снова от 1 до 3 секунд.
4. Равновесная температура смеси зонда от 15 до 30 ° C.
5. Отвортексируйте смесь зондов и убедитесь, что растворы хорошо смешаны.

ПРОЦЕДУРА ГИБРИДИЗАЦИИ
ThermoBrite (или аналог) должна быть использована для денатурации и гибридизации. Обратитесь к Руководству ThermoBrite Оператор для получения инструкции по использованию прибора.
1. Погрузите слайды в 70% этаноле в течение 1 минуты.
2. Погрузите слайды в 85% этаноле в течение 1 минуты.
3. Погрузите слайды в 100% этаноле в течение 1 минуты.
4. Высушите слайды в течение от 2 до 5 минут.
5. Смочите карты влажность с водой и поставьте в гнездо для карт ThermoBrite. Убедитесь, что поверхность ThermoBrite чистая и на ней нет мусора.
6. Установите температуру денатурации до 73°C и время денатурации до 3 минут. Установите температуру гибридизации (Hyb Temp) до 37°C, и время гибридизации с 14 до 24 часов.
7. Нанесите 10 мкл зонда смеси на каждый слайд, и сразу же наложите покровное стекло. Убедитесь, пузырьки воздуха не присутствуют в смеси зонда перед нанесением покровного стекла.
8. Зафиксируйте покровное стекло с помощью резиновой клея.
9. Поместите слайды на ThermoBrite и начните программу гибридизации.
10. По окончании процедуры гибридизации (от 16 до 24 часов) перейти к процедуре отмывки слайдов.

Постгибридизационная процедура

Используется Vysis Paraffin Pretreatment Kit IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit (List No. 01N31-005).
Внимание: Процедура промывки слайдов должна проводиться в тот день, когда гибридизация закончена.

Визуализация гибридизованных слайдов.

1. Высушите слайды в темноте.
2. Нанесите 10 мкл контркрасителя DAPI I на таргетную область и покройте покровным стеклом. Храните слайды в темноте.
3. Храните слайды при температуре от -20°C (±10°C). Если подсчет не будет происходить в течении 4 часов после окончания шага 2 слайды могут храниться до 10 дней.

Ожидаемые результаты
Ожидается, что в нормальных диплоидных ядрах или метафазных хромосомах возникают два желтых флуоресцентных BRAF сигнала, которые соответствуют двум таргетным локусам на гомологичных хромосомах, с которыми флуоресцентная BRAF проба связывается: 7q34. Набор хромосом, который имеет дополнительную копию (копии) BRAF (7q34) будет представлена более чем двумя желтыми флуоресцентными сигналами.

Ограничения использования
Интерпретация результатов FISH должна производиться с использованием соответствующих контрольных и аналитических методов, а также принимая во внимание другие клинические и диагностические исследования.[9,10]
Каждая лаборатория должна установить аналитические нормы для паттернов абнормальных сигналов, представляющих интерес.

Устранение неполадок
При просмотре результатов FISH убедитесь, что все настройки микроскопа оптимальны. В таблице ниже приведены причины, к которым могут привести использование проб LSI. А также возможные причины и предложения по повышению производительности анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Инструкция по устранению проблем

Проблема	Возможная причина	Решение
• Отсутствие сигнала или слабый сигнал	• Неподходящий набор фильтров • Нарушение работы микроскопа • Неподходящие лампы (т.е. ксеноновые или вольфрамовые) • Просроченная ртутная лампа • Смещение ртутной лампы • Грязные и/или потрескавшиеся собирательные линзы • Грязное или разбитое зеркало • Неподходящие условия гибридизации • Неподходящая температура промывочных растворов после гибридизации • Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, и зонд не достиг места назначения • Недостаточное количество гибридизационного раствора для среза • Неправильная обработка протеазой • Длительная фиксация среза (разъединение клеток) • Потеря ДНК (плохая окраска DAPI)	• Используйте рекомендуемые фильтры • Свяжитесь с техническим представителем компании производителем микроскопа • Используйте ртутную лампу (желательно, 100 Вт) • Замените старую лампу на новую • Выровняйте лампу • Протрите и замените линзы • Протрите или замените зеркало • Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37 ± 1ºC • Увеличьте продолжительность гибридизации (не менее 14 ч) • Убедитесь в том, что температура водяной бани составляет 73 - 75ºC • Уменьшите температуру промывочного раствора до 73ºC • Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда • Увеличьте количество гибридизационного раствора до 20 мкл на один срез • Убедитесь в том, что температура водяной бани составляет 37 ± 1ºC • Убедитесь в том, что pH буферного раствора составляет 1.0 ± 0.2 • Увеличьте продолжительность обработки протеазой с прибавкой по 5 минут. • Оптимальное время фиксации микропрепаратов, залитых парафином, составляет 1 – 2 суток. Более длительная фиксация приводит к прогрессирующему уменьшению интенсивности сигнала. • Соблюдайте условия фиксации.
• Изменение интенсивности	• Вариант нормы	• Если проблемные зоны хорошо окрашены DAPI, микропрепарат

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сигнала в срезе	• Из-за попадания пузырьков воздуха под покровное стекло зонд распределен по микропрепарату неравномерно • Слишком большой срез	можно использовать для подсчета ядер. • Повторите гибридизацию на следующем смежном срезе или на том же микропрепарате и убедитесь в том, что под покровное стекло не попали пузырьки воздуха. • Для больших срезов увеличьте объем гибридизационного раствора до20 мкл.
• Фоновые помехи	• Несоблюдение условий промывания	• Убедитесь в том, что pH промывочных растворов I и II составляет 7.0 – 7.5, в противном случае, утилизируйте раствор. • Убедитесь в том, что температура промывочного раствора составляет 73 - 75ºC • Во время промывания перемешивайте растворы • Увеличьте температуру промывочного раствора до 75ºC • Увеличьте продолжительность промывания до 5 минут
• Потеря ткани или нарушение ее морфологии	• Длительная фиксация среза (плохое окрашивание DAPI) • Неподходящие микропрепараты • Неправильная сушка микропрепаратов • Чрезмерная предварительная обработка • Чрезмерная денатурация • При удалении покровного стекла после гибридизации произошло повреждение среза ткани	• Убедитесь в соблюдении продолжительности и условий фиксации ткани • Используйте положительно заряженные предметные стекла • Убедитесь в том, что температура воздушного термостата составляет 56ºC • Убедитесь в том, что температура раствора для предварительной обработки составляет 80 ± 1°C • Уменьшите продолжительность предварительной обработки • Уменьшите продолжительность обработки протеазой • Уменьшите продолжительность денатурации • В буферном растворе покровное стекло должно отсоединиться

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Flaherty KT, McArthur G. BRAF, a target in melanoma: implications for solid tumor drug development. *Cancer.* 2010;116(21):4902–13.
2. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892): 949–54.
3. Zebisch A, Troppmair J. 2006. Back to the roots: The remarkable RAF oncogene story. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(11): 1314–30.
4. Modrek B, Ge L, Pandita A, et al. Oncogenic activating mutations are associated with local copy gain. *Mol Cancer Res.*
2009;7(8):1244-52.
5. Ciampi R, Zhu Z, Nikiforov YE. BRAF copy number gains in thyroid tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *Endocr Pathol.* 2005;16(2):99–105.
6. Tanami H, Imoto I, Hirasawa A, et al. Involvement of overexpressed wild-type BRAF in the growth of malignant melanoma cell lines. *Oncogene.* 2004;23(54):8796–804.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Willmore-Payne C, Holden JA, Hirschowitz S, Layfield LJ. BRAF and c-kit gene copy number in mutation-positive malignant melanoma. *Hum Pathol*. 2006;37(5):520–7.
8. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. Genome Res. 2002:12(6):996-1006.
9. Dewald GW. In: Fan SY, ed. *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2002;204:311-42.
10. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.
11. US Department of Health and Human Service. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www. cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline –Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual.* 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI BRAF SpectrumgGold FISH Probe и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,491,224,приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, и 6, 607, 877, приписанного [1]Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

©2010, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608482/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis PML/RARA SF FISH Probe Kit

en

REF 05N45-020

30-608283/R3

Vysis PML/RARA SF
FISH Probe Kit
REF 05N45-020
30-608283/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

ДНК-зонды для проведения флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) предназначены для детекции реципрокной транслокации t (15;17) (q22; q21.1), затрагивающей гены PML и RARA.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

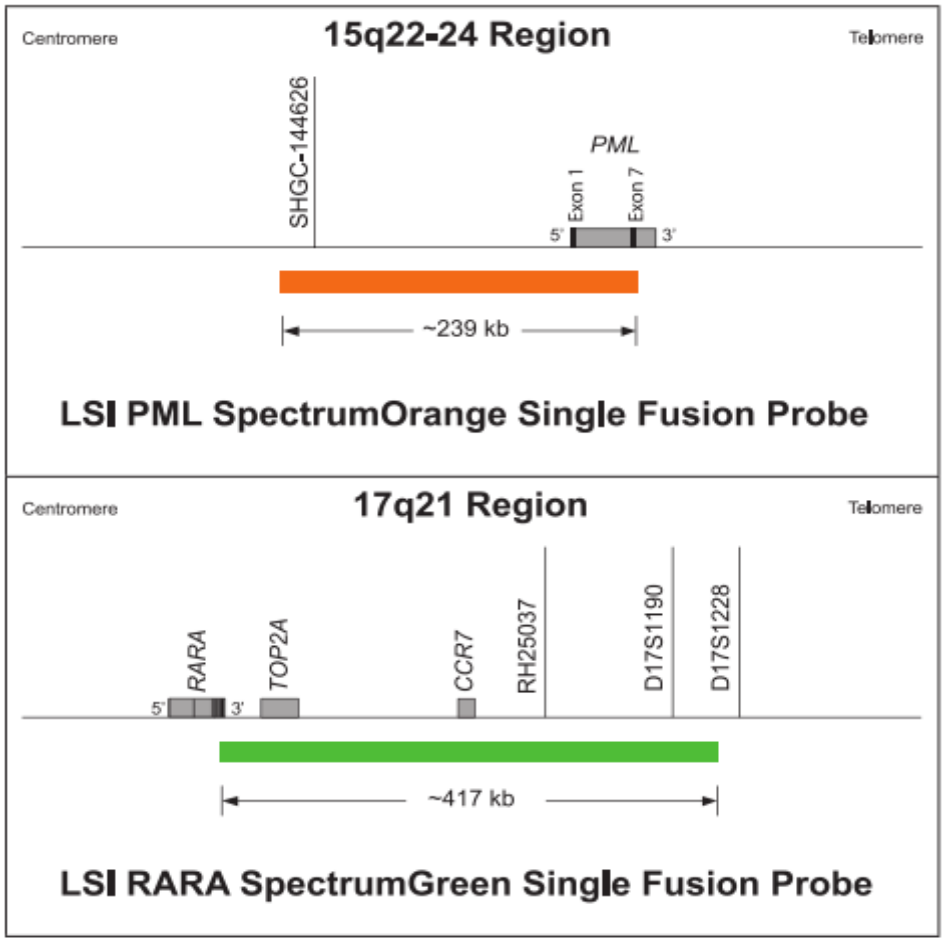
Подавляющее большинство случаев острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ) имеют транслокацию t (15;17) (q22; q21.1), образующуюся в результате слияние гена промиелоцитарной лейкемии (PML) на хромосоме 15q22-q24 с альфа-рецептором гена ретиноевой кислоты (RARA) на хромосоме 17q21.1[1] Слияние генов PML/RARA ассоциировано с хорошим ответом на терапию транс-ретиноевой кислотой.[1]

Vysis PML/RARA Dual Color Translocation Probe Kit использовали в исследовании для 260 пациентов с острым миелоидным лейкозом и обнаружили 11 позитивных случаев[2]. В этом же исследовании обычный G-бэндинг обнаружил только 7 положительных случаев из-за цитогенетической поломки и в одном случае криптической транслокации.

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Размером приблизительно 239 Kb (chr15:71877721-721 16436, Март 2006 Геномный браузер UCSC)[3] проба SpectrumOrange расположена в центромерной области гена PML.
Размером приблизительно 417 Kb (chr15:35762877-36180271 Март 2006 Геномный браузер UCSC)[3] проба SpectrumGreen расположена в теломерной области гена RARA.

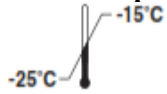


Реагенты

1. Зонд Vysis LSI PML/RARA Dual Color Single Fusion (серия № 30-191009)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 500 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и блокирующая ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Зонд Vysis LSI PML/RARA SF FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5) в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия транспортировки
Во время транспортировки зонд Vysis LSI PML/RARA SF FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**
Медицинское оборудование для диагностики in vitro
Vysis LSI PML/RARA SF FISH Probe Kit

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[7].
Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[10].

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI PML/RARA Dual Color Single Fusion Probes
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипеттор (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.
Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.
Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[4].

Ожидаемые результаты

Ожидаемый паттерн сигналов для зонда Vysis LSI PML/RARA Dual Color Single Fusion это два оранжевых и два зеленых сигнала.

Ожидаемый атипичный паттерн сигналов для зонда Vysis LSI PML/RARA Dual Color Single Fusion это один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту.
3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз.
4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

Подготовка слайдов для коденатурации

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
	Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Reiter A, Sausele S, Grimwade D, et al. Genomic anatomy of the specific reciprocal translocation t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2003;36:175-188.
2. Cox MC, Panetta P, Venditti A et al. Comparison between conventional banding analysis and FISH screening with an AML-specific set of probes in 260 patients. *The Hematology J.* 2003;4,263-270.
3. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002; 2(6):996-1006.
4. 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.
5. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020
30-608283/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis RPN1/MECOM DF
FISH Probe Kit
REF 06N60-010
30-608497/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Международное обслуживание клиентов:

Внимательно прочтите вкладыш перед использованием пробы. Должны быть соблюдены все рекомендации перед использованием пробы. Достоверность результатов анализа не может быть гарантирована, если исследования проводились с отклонением от инструкции.

НАЗНАЧЕНИЕ ПРОБЫ

Vysis RPN1/MECOM DF (Dual Fusion) Probe Kit FISH предназначена для детекции слиянимежду геном рибофорином I и MDS1, EVI1 комплексом генов (MECOM), с использованиемметода FISH (флуоресцентной гибридизации in situ).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Острый миелоидный лейкоз с инверсией (3) (q21;q26.2) или транслокацией (3;3) (q21;q26.2) представляют собой от 1 до 2% всех лейкозов. Это достаточно агрессивное заболевание с короткой продолжительностью жизни и плохим ответом на проводимую химиотерапию. Острый лимфобластный лейкоз с инверсией (3) (q21;q26.2) или транслокацией (3;3) (q21;q26.2) ассоциирован с неблагоприятным прогнозом. Эти нарушения могут также встречаться в похожем проценте миелодисплатических синдромов[1]. Благодаря появлению едва различимых перестроек, особенно инверсии (3), обычный цитогенетический анализ может пропустить

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

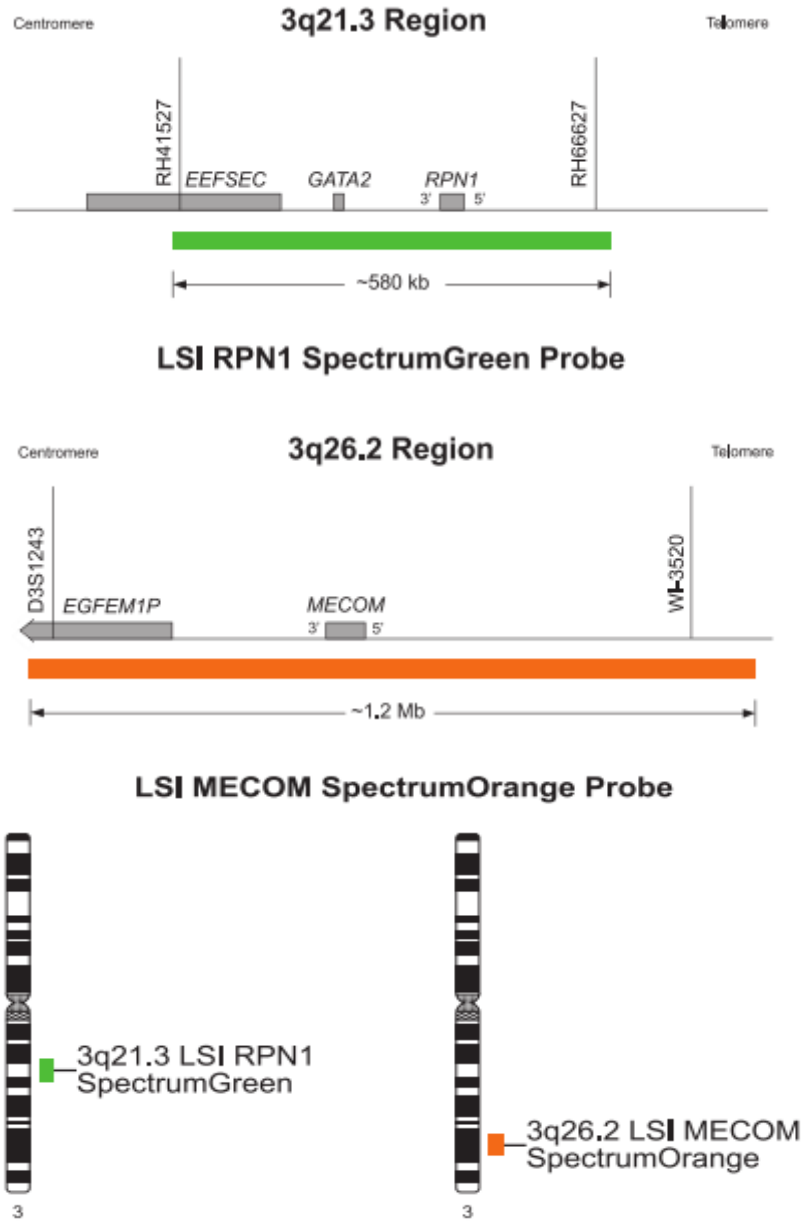
данные нарушения[2]. The Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit предназначена для идентификации перестроек между геном RPN1 и MECOM для детекции слияния LSI RPN1 SpectrumGreen и LSI MECOM SpectrumOrange сигналов, приводящих к хромосомным перестройкам между гибридизуемыми таргетами двух проб.

ПРИНЦИП FISH

Это метод, который позволяет визуализировать специфические сиквенсовые последовательности нуклеиновых кислот внутри клеточной популяции. В частности, FISH включает точный отжиг одноцепочечной, меченой флурохромом ДНК, комплементарной последовательности-мишени. Гибридизация зонда с участком внутриклеточной ДНК становится видимой благодаря прямой детекции с использованием флуоресцентного микроскопа.

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером приблизительно 580 Kb (Chr3:129466532-130046908, March 2006 assembly, University of California, Santa Cruz [UCSC] Genome Browser)[3] SpectrumGreen LSI RPN1 probe захватывает RPN1 ген на хромосоме 3q21.3. Размером приблизительно 1.2 Mb (Chr3:169797344-170950559, March 2006 assembly, UCSC Genome Browser)[3] SpectrumOrange LSI MECOM проба охватывает весь ген MECOM (MDS1 и EVI1 комплекс) на хромосоме 3q26.2.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI RPN1/MECOM Dual Color Dual Fusion Probes (Part No. 30-241003)
(1 пробирка, 10 мкл/пробирку). 500 нг/мкл Флуорофор-маркированная проба ДНК и ДНК блокированная в трис-ЭДТА)

2. Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации (Серийный номер 30-804822) (1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ

The Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit проба должна храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Следующие предупреждения относятся к пробе Vysis LSI RPN1/MECOM Dual Color Dual Fusion Probes:

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[4], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[5], CLSI документ M29-A3[6], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[7].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[11]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[14]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

The Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit предназначена для использования с образцами, которые хранились и были обработаны как указано в инструкции.

Не использовать пробу Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit по истечению срока годности.

Строго следуйте инструкции. Несоблюдение инструкции приводит к ошибочным результатам.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

- Все биологические образцы должны рассматриваться как потенциально опасные инфекционные агенты. Поскольку зачастую невозможно знать, какой из агентов является потенциально опасным, все биологические образцы должны быть обработаны с соблюдением универсальных мер предосторожности.
- Следует избегать взаимодействия образцов с кислотами, сильными основаниями, или действию высоких температур. Такие условия могут привести к разрушению ДНК и к неправильным результатам FISH исследования.
- Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации, детекции может привести к недопустимым или ошибочным результатам исследования.
- Флуорофоры легко распадаются под действием света. Для предотвращения этого распада, храните слайды и пробы в темноте, и обработка всех слайдов и наборов зондов должна осуществляться в защищенном от света месте.
- Выполните все шаги, которые не требуют света (периоды инкубации, отмывки и т.д.) в темноте или при минимальном освещении.
- The Vysis содержит Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit формамид, тератоген. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Калибровочные термометры предназначены для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
- Всегда проверяйте температуру промывочных растворов перед использованием, измеряя температуру растворов в сосудах Коплина с калибровочными термометрами.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с правилами утилизации опасных веществ.

АНАЛИЗ

Необходимые материалы

- Vysis LSI RPN1/MECOM Dual Color Dual Fusion Probes (Part No. 30-241003)
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (Part No. 30-804822)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Необходимые, но не поставляемые материалы
Лабораторные реагенты:
- Имерсионное масло для флуоресцентного микроскопа
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре
- Очищенная вода
- Клей
- 12N HCl
- 1N NaOH
- DAPI II Counterstain/Antifade (List No. 06J50-001)
- 20X SSC (List No. 02J10-032)
- NP-40 (List No. 07J05-001)

Лабораторное оборудование:
- Чистые силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1 – 10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймер
- Микроцентрифуга
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)
- Очищенная водяная баня (70°C to 80 C)
- Статичная водяная баня и водяная баня с циркуляцией (37єC)
- Стойкий к воздействию растворителей маркер (по желанию)
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Одноразовые наконечники (от 5 мл до 20 мл)
- Сосуды Коплина (12 Ч 50 мл рекомендуемый тип: вертикальный сосуд)
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендуемыми фильтрами
- Калибровочные термометры
- Магнитная мешалка
- pH метр
- Вортекс
- Фильтры 0,45 μm
- Инкубатор 37 °C
- Слайды (45 до 50 °C)
- ThermoBrite или эквивалент
- Карты влажности ThermoBrite

Микроскоп и дополнительные устройства
Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH. Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-п
Ороизводителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.
Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляноиммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75.

Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Гибридизация SpectrumOrange пробы к таргетному региону ДНК обозначается оранжевым сигналом флуоресценции. Присутствие всех других участков ДНК будет флуоресцировать голубым сигналом как результат окрашивания контркрасителем DAPI I. Компания Эббот Молекуляр (Abbott Molecular) выпускает наборы фильтров с одной и двумя полосами пропускания, которые оптимизированы для использования совместно с наборами ДНК-зондов LSI и подходят для большинства моделей флуоресцентных микроскопов. Рекомендуемые наборы фильтров для LSI MET SpectrumRed пробы это DAPI и красные одиночные фильтры.

Процедура анализа

Соблюдайте меры предосторожности, указанные в упаковке перед взятием образцов для работы.

Приготовление растворов этанола (70%, 85%, и 100%).

Подготовить объем / объемы разведения 70% и 85% с использованием 100% этанола и очищенной воды. Хранить при комнатной температуре в плотно закрытом контейнере если не используете. Растворы могут быть использованы в течение 1 недели, если не происходит испарение или раствор не становится разбавленным или мутным из-за многократного использования.

20X SSC раствор

Смешайте 66 г 20X SSC и 200 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI, если это необходимо. Доведите объем до 250 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

0.4X SSC/0.3% NP-40 Wash Solution

Смешайте 20 мл 20X SSC и 950 мл очищенной воды. Добавьте 3 мл NP-40 пока NP-40 полностью не растворится. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью 1 N NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. .Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC/0.1% NP-40 Wash Solution

Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед началом **автоматической денатурации/гибридизации** процедуры до завершения шага 4 этого раздела, убедитесь, что материалы выдержали достаточно времени для разморозки.
1. Перенесите 20X SSC раствор в сосуды Коплина.
2. Перенесите 20X SSC из сосудов Коплина на водяную баню приблизительно на 30 минут и перед использованием убедитесь, что раствор достиг температуры 37 ± 1°C.
3. Определите, что температура 20X SSC достигла 37 ± 1°C с помощью откалиброванных термометров.
4. Погрузите образцы слайдов в 20X SSC на 30 мин. при температуре 37 ± 1°C.
5. Используя пинцет, достаньте слайды из 20X SSC, немедленно погрузите слайды в сосуд Коплина, содержащий 70% этанол минимум на 2 минуты и встряхните слайды в сосуде Коплина от 1 до 3 секунд. После 70% этанола перенесите слайды в 85% этанол минимум на 2 минуты и затем в 100% этанол минимум на 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ Погрузите не более 4 слайдов одновременно в каждый сосуд Коплина. 6. После дегидратации в этаноле слайд может быть помещен в температуру 50 °C на 2 минуты, чтобы полностью завершить сушку перед нанесением пробы.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ/ГИБРИДИЗАЦИЯ ПРОБЫ
1. Достаньте ДНК-пробы, LSI/WCP Hybridization Buffer и очищенную воду из упаковки и дождитесь, пока реагенты достигнут комнатной температуры.
2. Отвортексируйте ДНК-пробы, LSI/WCP Hybridization Buffer в течении 2-3 секунд.
3. Центрифугируйте в течении 2-3 секунд.
4. Перенесите 7 мкл LSI/WCP Hybridization Buffer, 2 мкл очищенной воды, 1 мкл ДНКпробы в 1,5 мл эппендорфы.
5. Отвортексируйте и отцентрифугируйте смесь еще раз тщательно.
6. образец и незамедлительно накройте покровным стеклом, избегая образования пузырей.
7. Заклейте покровное стекло, используя резиновый клей.
8. Перед добавлением образцов слайдов, вставьте карты влажности ThermoBrite в специальное углубление под крышкой системы ThermoBrite. Позвольте закладкам внутри крышки поддерживать карты. Обратитесь к руководству по эксплуатации ThermoBrite относительно повторных карт влажности при последующих запусках.
9. После того как карты влажности вставлены, насыщайте полоски дистилированной водой.
10. Включите питание в системе ThermoBrite денатурации/гибридизации.

ПРИМЕЧАНИЕ
Включатель системы ThermoBrite расположен на задней панели. Прибор издаст звуковой сигнал, чтобы сообщить, что он включился. Главное меню будет отображаться, когда прибор наберет температуру 37°C.
11. Установите на ThermoBrite программу, согласно следующим параметрам:
- Время денатурации: 2 минуты
- Температура денатурации: 73 °C
- Время гибридизации: 12 до 24 часов
- Температура гибридизации: 37 °C

12. После установления программы поместите образцы слайдов на прогретую

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

поверхность 7,0±0,2. Аккуратно протолкните образцы к середине пластины, состыковав край слайда с маркированной позицией на панели слайдов.
ВНИМАНИЕ: Если происходит гибридизация менее чем 12 слайдов, используйте пустые слайды, чтобы общее количество слайдов было равно 12. 13. Закройте крышку ThermoBrite. Курсором нужно выделить линию PGM. Нажмите кнопку Enter для подтверждения.

ПРОЦЕДУРА ПРОМЫВКИ

1. Перенесите 70 мл **0.4X SSC/0.3% NP-40** и 70 мл **2X SSC/0.1% NP-40** в отдельные сосуды Коплина. Перенесите сосуды Коплина, содержащие **0.4X SSC/0.3% NP-40** на водяную баню приблизительно на 30 минут перед использованием. Доведите **2X SSC/0.1%NP-40** до комнатной температуры. Используйте приготовленный раствор только в течении одного дня и дальше утилизируйте.
2. Убедитесь, что температура **2X SSC/0.1% NP-40** 73±1 °C, используя откалиброванные термометры.
3. Достаньте образцы слайдов из ThermoBrite.
4. Удалите покровное стекло с одного слайда и сразу же погрузите слайд в **0.4X SSC/0.3% NP-40.** Перемешайте слайд в сосуде Коплина в течении 1-3 секунды. Повторите процесс с другими слайдами до достижения количества 4 слайдов. Начните отсчет времени, когда будет опущен в раствор 4 слайд.
ВНИМАНИЕ: Для поддержания нужной температуры в **0.4X SSC/0.3% NP-40** необходимо промывать 4 слайда одновременно. Если у вас менее 4 слайдов, добавьте пустые слайды, чтобы общее количество стало 4.
5. Удалите слайды после 2 минут ± 30 секунд.
6. Погрузите слайды в сосуды Коплина, содержащие **0.4X SSC/0.3% NP-40.**
Перемешайте слайды в сосуде Коплина в течении 3-5 секунд.
7. Удалите слайды из **0.4X SSC/0.3% NP-40** где они были погружены от 5 до 60 секунд.
ВНИМАНИЕ: Для промывки дополнительных слайдов, убедитесь, что температура промывочного раствора 73±1 °C.

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

1. Высушите каждый слайд коснувшись нижнего края слайда на бумажном полотенце и вытрите нижнюю сторону слайда, ту сторону, которая не содержит образец, высушите на бумажном полотенце.
2. Высушите слайды в темноте на длинной стороне слайда для ускорения испарения и прекратите взаимодействие с **2X SSC/0.1% NP-40** максимум на 2 часа.
3. Достаньте конткраситель DAPI II из упаковки и дождитесь, пока реагент достигнет комнатной температуры.
4. Отвортексируйте DAPI II в течении 2-3 секунд.
5. Отцентрифугируйте конткраситель DAPI II 2-3 секунды.
6. Используя пипетку, добавьте 10 мкл контркрасителя DAPI II к каждому таргетному образцу на слайде и накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для каждого слайда.
7. Подождите минимум 10 минут до начала работы на микроскопе.

Процедура архивации

Храните слайды после гибридизации при температуре -20 °C избегая попадания света. В таких условиях слайды могут храниться вместе с осушителем в течении 3 недель после нанесения контркрасителя DAPI II без существенной потери интенсивности сигнала.

Исследование слайдов

Просмотр слайдов производится с учетом использования подходящего фильтра на

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

флуоресцентном микроскопе. Следующие наборы оптических фильтров используются при визуализации флуорофоров при гибридизации.

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
Одиночный зеленый	SpectrumGreen флуорохром
Одиночный оранжевый	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Двойной оранжевый/зеленый	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
Тройной – DAPI, Green, Orange	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Фильтры, оптически эквивалентные фильтрам Vysis, также могут использоваться. Например, Chroma® 82000, используется с фильтрами 82102 это эквивалент Vysis Orange/Green v2 фильтра.

Интерпретация результатов

Контроль качества

Оценка достаточности слайда

Оценка адекватности слайда используется по следующим критериям. Если критерии невстречаются, образцы слайдов не должны оцениваться.

Ядерная морфология: Границы ядер должны быть хорошо различимы и не повреждены.

Общая информация: Фон, который возникает, должен быть темный или черный и относительно свободный от люминисцентных частиц и помутнения.

Интенсивность сигнала пробы: Сигнал должен быть ярким, компактным, округлой или овальной формы, отличимым и легко оцениваемым.

Подсчет сигналов:

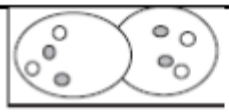
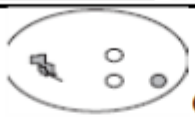
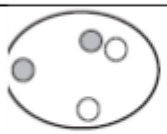
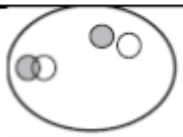
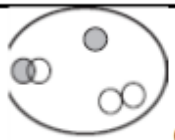
- Используя необходимые фильтры, перечисленные выше, две технологии, каждая для подсчета ядер с сигналами паттернов на каждые сто ядер. Первый исследователь оценивает ядра на левой стороне гибридизационной мишени (которая определяется лучше), второй исследователь оценивает ядра на правой стороне гибридизационной мишени (которая определяется лучше). Обратитесь к таблице 1 для подсчета сигналов.
- Выберите только неповрежденные ядра, которые не свернуты, не перекрыты и не завалены омертвевшими клетками.
- Избегайте подсчета слайдов или площадей внутри слайдов, которые имеют чрезмерно неспецифическую гибридизацию или много ядер, которые имеют чрезмерно много или чрезмерно мало сигналов.
- Избегайте подсчета ядер со сгустками или облаками сигналов.
- Сигналы одинакового цвета могут не быть одной интенсивности в данном ядре.
- Таким образом, возникает необходимость использовать соответствующий одиночный фильтр и/или приспособить фокальную плоскость.
- Сигналы одного цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом.
- Если это небольшие нити сигналов, соединяющих разделенные сигналы, они также подсчитываются как один сигнал.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Оранжевые или зеленые пары сигналов с наложением или с зазором менее чем один сигнал считаются как слитные.
- Если образец имеет низкий уровень абнормальных FISH паттернов, используется соответствующий фильтр пропускания для подтверждения паттернов, которые рекомендованы.
- Несоблюдение этих рекомендаций может привести к неточности при идентификации сигналов.
- Если есть какие-то сомнения относительно того, должны ли быть подсчитаны клетки или нет, не подсчитывайте клетки.

Таблица 1 Подсчет двойных сигналов.

○ Зеленый сигнал
● Оранжевый сигнал

1.	 Если ядра перекрываются, не подсчитывать
2.	 Считать как два оранжевых и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал слитный
3.	 Считать как один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Оранжевый/зеленый пары сигналов с наложением или зазаром менее чем один оранжевый или один зеленый сигналы подсчитываются как слитный. Верхняя пара сливается, нижняя нет.
4.	 Считается как два слитных сигнала. Верхние пары оранжевого/зеленого сигналов имеют зазор менее одного сигнала. Пары верхних сигналов перекрываются.
5.	 Считается как один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Зеленый сигнал разделяется.

Ограничение в использовании

Интерпретация результатов FISH-исследования должна проходить с помощью соответствующих контрольных и аналитических методов, а также принимая во внимание другие клинические и диагностические исследования. Индивидуальные лаборатории должны установить аналитически нормальную отсечку для каждого интересующего абнормального сигнала паттернов.

Ограничение процедуры

- Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit предназначена для использования в комбинации с дополнительными биомаркерами, морфологией и другой дополнительной информацией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Если образцы имеют низкий уровень абнормальных паттернов FISH, используйте соответствующий одиночный фильтр для подтверждения паттернов, как это рекомендовано. Несоблюдение рекомендаций может привести к неточной идентификации сигналов.
• Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit оптимизирована для идентификации слияния между геном RPN1 и геном MECOM, используя костный мозг и периферическую кровь.

Особые характеристики

Аналитическая метафазная чувствительность и специфичность

Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов, которые гибридизуются в правильном локусе, а не в каком-либо другом локусе. Аналитическая чувствительность определяется как процент хромосомных мишеней с ожидаемыми сигналами паттернов.

Аналитическая специфичность Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit проба для соответствующих таргетных локусов на хромосоме была опубликована, используя метафазные хромосомы, подготовленные из культуры периферической крови пяти кариотипически нормальных образцов слайдов. Локализация гибридизации каждого FISH сигнала на хромосоме от 20 последовательных метафазных ядер на каждом из пяти слайдов оценено в общей сложности 200 таргентных локусов.

Для каждой пробы и образца было подсчитано количество FISH сигналов на метафазных хромосомах гибридизуемых с правильным локусом и число FISH сигналов на метафазных хромосомах, гибридизуемых с неправильным локусом. Специфичность каждой пробы была рассчитана как число FISH сигналов на метафазных хромосомах гибридизуемых с правильным локусом, поделенное на общее количество гибридизуемых FISH сигналов на метафазных хромосомах и умноженное на 100 для получения процента.

Аналитическая специфичность Vysis LSI RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit была 100%, как показано в таблице 2. Чувствительность каждой пробы была подсчитана как количество гибридизуемых FISH сигналов метафазных хромосом с правильным локусом, разделенное на 200 таргетных локусов и умноженное на 100 для получения процента.

Аналитическая чувствительность Vysis LSI RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit была 100%, как показано в таблице 2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Табл. 2 Метафазная аналитическая чувствительность и специфичность

Табл. 2 Метафазная аналитическая чувствительность и специфичность

Правильная цитогенетическая мишень	Ожидаемое	Гибридизуемое с правильным локусом-мишенью	Гибридизуемое с неправильным локусом-мишенью	Чувствительность	Специфичность
3q21.3	200	200	0	100	100
3q26.2	200	200	0	100	100

Табл. 3 Соблюдаемый диапазон подсчетов (на 200 ядер)

Сигнал	2R2G	2F	1R1G1F	1R1G2F
Нормальный #2	82-120	18-36	52-76	0
Нормальный #5	92-99	17-31	53-72	0-2
Нормальный #6	77-115	22-33	54-83	0-1
Абнормальный #1	7-10	15-20	31-45	107-127
Абнормальный #3**	9-57	20-21	42-69	55-75
Абнормальный #4	3-12	10-15	19-40	125-131

БИБЛИОГРАФИЯ

1. The International Agency for Research on Cancer. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.*
Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al, eds. 4th ed. World Health Organization; 2008.
2. Shearer BM, Sukov WR, Flynn HC, Knudson RA, Ketterling RP. Development of a dual-color, double fusion FISH assay to detect RPN1/EVI1 gene fusion associated with inv(3), t(3;3), and ins(3;3) in patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2010;85(8):569-574.
3. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.
4. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
5. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
7. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
8. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis RPN1/MECOM DF FISH Probe Kit разрешены на основании европейского патента 5, 663, 319, и 5, 491, 224 приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, и 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы обнаружения генетических транслокаций защищены патентом США 6, 280, 929 и лицензированы исключительно для Abbott Mol. Методы детекции множественных сигналов гибридизации защищены американскими патентами 6, 203, 977, приписанного [2] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

©2012, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608497/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 06N24-010

30-608486/R4

Vysis PDGFRB Break Apart
FISH Probe Kit
REF 06N24-010

30-608486/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-10°C -30°C	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

The Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit предназначена для детекции хромосомных перестроек, включающий тромбоцитарный фактор роста гена бета рецептора (PDGFRB) на хромосоме 5q-32-q33 с использую технологию флуоресцентной гибридизации in situ.

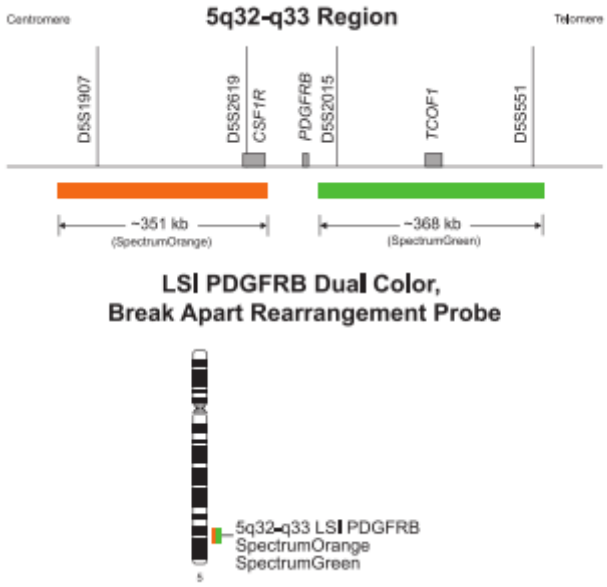
НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Перестройки гена PDGFRB это регулярно повторяющиеся перестройки в категории лимфопролиферативных заболеваний миелоидных и лимфоидных новообразований с эозинофилией и абнормальными перестройками генов. DGFRA, PDGFRB, и FGFR1[1,2]. Перестройка в гене PDGFRB появляется в результате слияния одного из генов с 15 различными известными паттерными генами.[3] Перестройки пробы Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit, включающей ген PDGFRB детектируются путем разделения сигналов LSI PDGFRB Spectrum Orange и LSI PDGFRB Spectrum Green, возникающего в результате хромосомных перестроек между гибридизуемыми мишенями двух проб.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание пробы

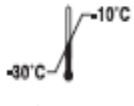
Проба Spectrum Orange имеет размер приблизительно 351 кb (Chr5:149100088-149451543, March 2006 assembly) и располагается в центромерном регионе гена PDGFRB. Spectrum Green проба имеет размер приблизительно 368 kb (Chr5:149543318-149911781, March 2006 assembly) и располагается в теломерном регионе гена PDGFRB.



Реагенты

1. Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Part No. 30-231038) (1 флакон, 10 µL на флакон) меченый флуорофором ДНК зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).
2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30804824). Таблицы с Данными о Безопасности Материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

ХРАНЕНИЕ



Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe необходимо хранить при температуре -20°C, в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Транспортировка набора **Vysis** LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Обратитесь к инструкции ThermoBrite, Раздел «Опасность», инструкциям по технике безопасности.

Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[5]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[8]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
The Vysis **PDGFRB Break Apart** FISH Probe Kit предназначена только для использования с образцами, которые обработаны и хранятся в соответствии с инструкцией, находящейся внутри набора.
• Не используйте Vysis **PDGFRB Break Apart** FISH Probe Kit по истечению срока годности, указанной на упаковке.
• Следуйте инструкции. Несоблюдение инструкции может привести к ошибочным результатам.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
• Не подвергайте образцы взаимодействию с кислотами, сильными основаниями и действию высоких температур. Такие взаимодействия как известно могут разрушить ДНК и привести к неправильному результату FISH –анализа.
• Несоблюдение всех процедур денатурации слайдов, гибридизации и детекции могут привести к неприемлимым или ошибочным результатам.
• Условия гибридизации могут негативно отображаться, если вы используете другие зонды, чем те, которые предлагает Abbott Molecular.
• Хранить реагенты необходимо до истечения их срока годности. На результаты могут негативно повлиять другие условия хранения, отличные от тех, что указаны на упаковке.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
- Всегда проверяйте температуру растворов для предварительной обработки и промывочных буферов перед каждым использованием путем измерения температуры в сосудах Коплина, используя калибровочные термометры.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с вашими руководствами по безопасной утилизации.
- Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении.
- **PDGFRB Break Apart** FISH Probe Kit содержит формамид, который является тератогеном. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Процедура оптимизирована для образцов тканей легкого, заключенного в парафин.
- Перед использованием оставить реагенты при комнатной температуре (от 15 до 30°C), отцентрифугируйте каждую пробирку в течении 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Необходимые материалы

- Vysis LSI PDGFRB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Vysis LSI/WCP гибридизационный буфер

Необходимые, но не поставляемые материалы

Лабораторные реагенты

- Имерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Очищенная вода
- Клей
- 12N HCl
- 1N NaOH
- Конткраситель DAPI II (№ 06J50-001)
- 20X SSC (№02J10-032)
- NP-40 (07J05-001)

Лабораторное оборудование

- Очищенные покровные стекла для микроскопа
- 22 ммЧ 22 мм покровные стекла
- Микродозаторы (от 1 до 10 мкл) с наконечниками
- Таймер
- Микроцентрифуги
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)
- Водяные бани (от 70 до 80 С)
- Водяные бани (37 С)
- Устойчивый маркер
- Ножницы
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Одноразовые пипетки (от 5 до 20 мл)
- Сосуды Коплина (12Ч50 мл). Рекомендуемый тип: Продукт Уинтон № 900570 вертикальный сосуд для окрашивания.
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендуемыми фильтрами
- Калибровочные термометры
- Коробочка с крышкой из слайдов для микроскопа
- Магнитные мешалки
- pH метр

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Вортекс
- 0,45 мм фильтрационные единицы
- 37 С инкубатор
- Слайды (45 до 50 С)
- Термобрайт
- Карты влажности Термобрайт

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH. Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляноиммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Гибридизация SpectrumOrange пробы к таргетному региону ДНК обозначается оранжевым сигналом флуоресценции. Гибридизация SpectrumGreen пробы к таргетному региону ДНК обозначается зеленым сигналом флуоресценции.

Процедура анализа

Соблюдайте меры предосторожности, указанные в упаковке перед взятием образцов для работы.

Приготовление растворов этанола (70%, 85%, и 100%).

Подготовить объем / объемы разведения 70% и 85% с использованием 100% этанола и очищенной воды. Хранить при комнатной температуре в плотно закрытом контейнере если не используете. Растворы могут быть использованы в течение 1 недели, если не происходит испарение или раствор не становится разбавленным или мутным из-за многократного использования.

20X SSC раствор

Смешайте 66 г 20X SSC и 200 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI, если это необходимо. Доведите объем до 250 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

0.4X SSC/0.3% NP-40 Wash Solution

Смешайте 20 мл 20X SSC и 950 мл очищенной воды. Добавьте 3 мл NP-40 пока NP-40 полностью не растворится. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью 1 N NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. .Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC/0.1% NP-40 Wash Solution

Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед началом **автоматической денатурации/гибридизации** процедуры до завершения шага 4 этого раздела, убедитесь, что материалы выдержали достаточно времени для разморозки.

1. Перенесите 20X SSC раствор в сосуды Коплина.
2. Перенесите 20X SSC из сосудов Коплина на водяную баню приблизительно на 30 минут и перед использованием убедитесь, что раствор достиг температуры 37±1°C.
3. Определите, что температура 20X SSC достигла 37 ± 1°C с помощью откалиброванных термометров.
4. Погрузите образцы слайдов в 20X SSC на 30 мин. при температуре 37± 1°C.
5. Используя пинцет, достаньте слайды из 20X SSC, немедленно погрузите слайды в сосуд Коплина, содержащий 70% этанол минимум на 2 минуты и встряхните слайды в сосуде Коплина от 1 до 3 секунд. После 70% этанола перенесите слайды в 85% этанол минимум на 2 минуты и затем в 100% этанол минимум на 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ Погрузите не более 4 слайдов одновременно в каждый сосуд Коплина.

6. Высушите слайды.
7. После дегидратации в этаноле слайд может быть помещен в температуру 50°C на 2 минуты, чтобы полностью завершить сушку перед нанесением пробы.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ/ГИБРИДИЗАЦИЯ ПРОБЫ

1. Достаньте ДНК-пробы, LSI/WCP Hybridization Buffer и очищенную воду из упаковки и дождитесь, пока реагенты достигнут комнатной температуры.
2. Отвортексируйте ДНК-пробы, LSI/WCP Hybridization Buffer в течении 2-3 секунд.
3. Центрифугируйте в течении 2-3 секунд.
4. Перенесите 7 мкл LSI/WCP Hybridization Buffer, 2 мкл очищенной воды, 1 мкл ДНК-пробы в 1,5 мл эппендорфы.
5. Отвортексируйте и отцентрифугируйте смесь еще раз тщательно.
6. Используя микропипетку добавьте 10 мкл смеси пробы на исследуемый образец и незамедлительно накройте покровным стеклом, избегая образования пузырей.
7. Заклейте покровное стекло, используя резиновый клей.
8. Перед добавлением образцов слайдов, вставьте карты влажности ThermoBrite в специальное углубление под крышкой системы ThermoBrite.

Позвольте закладкам внутри крышки поддерживать карты. Обратитесь к руководству по эксплуатации ThermoBrite относительно повторных карт
влажности при последующих запусках.

9. После того как карты влажности вставлены, насыщайте полоски дистилированной водой.
10. Включите питание в системе ThermoBrite денатурации/гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ
Включатель системы ThermoBrite расположен на задней панели. Прибор издаст звуковой сигнал, чтобы сообщить, что он включился. Главное меню будет отображаться, когда прибор наберет температуру 37 °C.

11. Установите на ThermoBrite программу, согласно следующим параметрам:

- Время денатурации: 2 минуты
- Температура денатурации: 73°C
- Время гибридизации: 12 до 24 часов
- Температура гибридизации: 37°C

12. После установления программы поместите образцы слайдов на прогретую поверхность 7,0±0,2. Аккуратно протолкните образцы к середине пластины, состыковав край слайда с маркированной позицией на панели слайдов.

ВНИМАНИЕ: Если происходит гибридизация менее чем 12 слайдов, используйте пустые слайды, чтобы общее количество слайдов было равно 12.

13. Закройте крышку ThermoBrite. Курсором нужно выделить линию PGM. Нажмите кнопку Enter для подтверждения.

ПРОЦЕДУРА ПРОМЫВКИ

1. Перенесите 70 мл **0.4X SSC/0.3% NP-40** и 70 мл **2X SSC/0.1% NP-40** в отдельные сосуды Коплина. Перенесите сосуды Коплина, содержащие **0.4X SSC/0.3% NP-40** на водяную баню приблизительно на 30 минут перед использованием. Доведите **2X SSC/0.1% NP-40** до комнатной температуры. Используйте приготовленный раствор только в течении одного дня и дальше утилизируйте.
2. Убедитесь, что температура **2X SSC/0.1% NP-40** 73±1°C, используя откалиброванные термометры.
3. Достаньте образцы слайдов из ThermoBrite.
4. Удалите покровное стекло с одного слайда и сразу же погрузите слайд в **0.4X SSC/0.3% NP-40.** Перемешайте слайд в сосуде Коплина в течении 1-3секунды. Повторите процесс с другими слайдами до достижения количества 4 слайдов. Начните отсчет времени, когда будет опущен в раствор 4 слайд.

ВНИМАНИЕ: Для поддержания нужной температуры в **0.4XSSC/0.3%NP-40** необходимо промывать 4 слайда одновременно. Если у вас менее 4 слайдов, добавьте пустые слайды, чтобы общее количество стало 4.

5. Удалите слайды после 2 минут ± 30 секунд.
6. Погрузите слайды в сосуды Коплина, содержащие **0.4X SSC/0.3% NP40.**
Перемешайте слайды в сосуде Коплина в течении 3-5 секунд.
7. Удалите слайды из **0.4X SSC/0.3% NP-40** где они были погружены от 5 до 60 секунд.

ВНИМАНИЕ: Для промывки дополнительных слайдов, убедитесь, что температура промывочного раствора 73±1°C.

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

1. Высушите каждый слайд коснувшись нижнего края слайда на бумажном полотенце и вытрите нижнюю сторону слайда, ту сторону, которая не содержит образец, высушите на бумажном полотенце.
2. Высушите слайды в темноте на длинной стороне слайда для ускорения испарения и прекратите взаимодействие с **2X SSC/0.1% NP-40** максимум на 2 часа.
3. Достаньте конткраситель DAPI II из упаковки и дождитесь, пока реагент достигнет комнатной температуры.
4. Отвортексируйте DAPI II в течении 2-3 секунд.
5. Отцентрифугируйте конткраситель DAPI II 2-3 секунды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Используя пипетку, добавьте 10 мкл контркрасителя DAPI II к каждому таргетному образцу на слайде и накройте покровным стеклом. Повторите
процедуру для каждого слайда.
7. Подождите минимум 10 минут до начала работы на микроскопе.

Исследование слайдов

Просмотр слайдов производится с учетом использования подходящего фильтра на флуоресцентном микроскопе. Следующие наборы оптических фильтров используются при визуализации флуорофоров при гибридизации.

Использование фильтров Vysis	Одновременное возбуждение и эмиссия
Одиночный зеленый	SpectrumGreen флуорохром
Одиночный оранжевый	SpectrumOrange флуорохром
Двойной оранжевый/зеленый	SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорохромы
Тройной – DAPI, Green, Orange	DAPI, SpectrumGreen, SpectrumOrange флуорохромы

Фильтры, оптически эквивалентные фильтрам Vysis, также могут использоваться. Например, Chroma® 82000, используется с фильтрами 82102 это эквивалент Vysis Orange/Green v2 фильтра.

Интерпритация результатов

Контроль качества

Оценка достаточности слайда

Оценка адекватности слайда используется по следующим критериям. Если критерии не встречаются, образцы слайдов не должны оцениваться.

- Ядерная морфология: Границы ядер должны быть хорошо различимы и не повреждены.
- Общая информация: Фон, который возникает, должен быть темный или черный и относительно свободный от люминисцентных частиц и помутнения. Интенсивность сигнала пробы:
- Сигнал должен быть ярким, компактным, округлой или овальной формы, отличимым и легко оцениваемым.

Подсчет сигналов:

Используя необходимые фильтры, перечисленные выше, две технологии, каждая для подсчета ядер с сигналами паттернов на каждые сто ядер.

Первый исследователь оценивает ядра на левой стороне гибридизационной мишени (которая определяется лучше), второй исследователь оценивает ядра на правой стороне гибридизационной мишени (которая определяется лучше). Обратитесь к таблице 1 для подсчета сигналов.

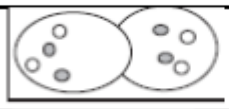
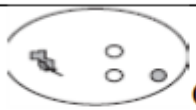
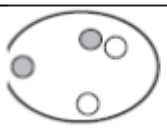
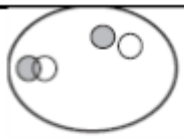
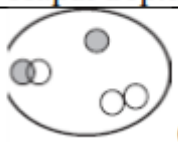
- Выберите только неповрежденные ядра, которые не свернуты, не перекрыты и не завалены омертвевшими клетками.
- Избегайте подсчета слайдов или площадей внутри слайдов, которые имеют чрезмерно неспецифическую гибридизацию или много ядер, которые имеют чрезмерно много или чрезмерно мало сигналов.
- Избегайте подсчета ядер со сгустками или облаками сигналов.
- Сигналы одинакового цвета могут не быть одной интенсивности в данном ядре. Таким образом, возникает необходимость использовать соответствующий одиночный фильтр и/или приспособить фокальную плоскость.
- Сигналы одного цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом.
- Если это небольшие нити сигналов, соединяющих разделенные сигналы, они также подсчитываются как один сигнал.
- Оранжевые или зеленые пары сигналов с наложением или с зазором менее чем один сигнал считаются как слитные.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Если образец имеет низкий уровень абнормальных FISH паттернов, используется соответствующий фильтр пропускания для подтверждения паттернов, которые рекомендованы.
- Несоблюдение этих рекомендаций может привести к неточности при идентификации сигналов.
- Если есть какие-то сомнения относительно того, должны ли быть подсчитаны клетки или нет, не подсчитывайте клетки.

Таблица 1 Подсчет двойных сигналов

○ Зеленый сигнал
● Оранжевый сигнал

1.	 Если ядра перекрываются, не подсчитывать
2.	 Считать как два оранжевых и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал слитный
3.	 Считать как один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Оранжевый/зеленый пары сигналов с наложением или зазаром менее чем один оранжевый или один зеленый сигналы подсчитываются как слитный. Верхняя пара сливается, нижняя нет.
4.	 Считается как два слитных сигнала. Верхние пары оранжевого/зеленого сигналов имеют зазор менее одного сигнала. Пары верхних сигналов перекрываются.
5.	 Считается как один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Зеленый сигнал разделяется.

Ограничение в использовании

Интерпретация результатов FISH-исследования должна проходить с помощью соответствующих контрольных и аналитических методов, а также принимая во внимание другие клинические и диагностические исследования[9].

Индивидуальные лаборатории должны установить аналитически нормальную отсечку для каждого интересующего абнормального сигнала паттернов.[9]

Ограничение процедуры

The Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit предназначена для использования в комбинации с дополнительными биомаркерами, морфологией и другой дополнительной информацией.

Если образцы имеют низкий уровень абнормальных паттернов FISH, используйте соответствующий одиночный фильтр для подтверждения паттернов, как это рекомендовано. Несоблюдение рекомендаций может привести к неточной идентификации сигналов.

Ожидаемые результаты

Ожидаемые нормальные сигналы паттернов Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe это два оранжевых/два зеленых слитных сигнала, которые могут рассматриваться как смежные

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

оранжевый/зеленый сигналы слегка разделенные благодаря разрывам между двумя пробами. Ожидаемые абнормальные паттерны Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe с перестройками, включающими PDGFRB ген это один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал. Могут встречаться и другие абнормальные сигналы паттернов и метефазный анализ может быть полезен в характеристике таких паттернов.

Особые характеристики

Аналитическая метафазная чувствительность и специфичность

Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов, которые гибридизуются в правильном локусе, а не в каком-либо другом локусе.

Аналитическая чувствительность определяется как процент хромосомных мишеней с ожидаемыми сигналами паттернов.

Аналитическая специфичность Vysis LSI PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit проба для соответствующих таргетных локусов на хромосоме была опубликована, используя метафазные хромосомы, подготовленные из культуры периферической крови пяти кариотипически нормальных образцов слайдов. Локализация гибридизации каждого FISH сигнала на хромосоме от 20 последовательных метафазных ядер на каждом из пяти слайдов оценено в общей сложности 200 таргентных локусов.

Для каждой пробы и образца было подсчитано количество FISH сигналов на метафазных хромосомах гибридизуемых с правильным локусом и число FISH сигналов на метафазных хромосомах, гибридизуемых с неправильным локусом. Специфичность каждой пробы была рассчитана как число FISH сигналов на метафазных хромосомах гибридизуемых с правильным локусом, поделенное на общее количество гибридизуемых FISH сигналов на метафазных хромосомах и умноженное на 100 для получения процента.

Аналитическая специфичность Vysis LSI PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit была 100%, как показано в таблице 2. Чувствительность каждой пробы была подсчитана как количество гибридизуемых FISH сигналов метафазных хромосом с правильным локусом, разделенное на 200 таргетных локусов и умноженное на 100 для получения процента.

Аналитическая чувствительность Vysis PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit была 100%, как показано в таблице 2.

Табл. 2 Метафазная аналитическая чувствительность и специфичность

Проба	Правильная цитогенетическая мишень	Ожидаемое	Гибридизуемое с правильным локусом-мишенью	Гибридизуемое с неправильным локусом-мишенью	Чувствительность	Специфичность
LSI PDGFRB (Cen)	5q32-q33	200	200	0	100	100
LSI PDGFRB (Tel)	5q32-q33	200	200	0	100	100

Представление

Производительность была оценена путем тестирования пяти нормальных образцов пациента (от пациентов, у которых не содержатся перестройки, включающие регион гена PDGFRB на 5q32-q33 на основе результатов предыдущего теста) и абнормальных образцов (образцов от пациентов, которые содержат перестройки включающие регион гена PDGFRB на 5q32q33 на основе результатов предыдущего теста).

Закодированные слайды были сделаны из PDGFRB нормальных и абнормальных образцов.

В общей сложности пять нормальных слайдов, каждый от разного образца, и три слайда от абнормальных образцов были гибридизованы. Сигналы паттернов были подсчитаны для каждого образца слайдов от 200 интерфазных ядер. Каждый из двух пользователей оценивал 100 ядер на образец из общего количества 200 ядер на образец.

Ожидаемые нормальные сигналы паттернов LSI PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit это два оранжевых/два зеленых слитных сигнала, которые могут рассматриваться как смежные оранжевый/зеленый сигналы слегка разделенные благодаря разрывам между двумя пробами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ожидаемые абнормальные паттерны LSI PDGFRB Break Apart FISH Probe Kit на образце с перестройкой гена PDGFRB это один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал.

Результаты представлены в таблице 3

Таблица 3
Диапазон 2 слитных и 1 красный 1 зеленый и 1 слитный сигнал
Подсчет сигналов (на каждые 200 ядер)

	2 слитных	1 красный один зеленый один слитный
Нормальные	155-188	0-2
Абнормальные	74-96	82-106

БИБЛИОГРАФИЯ

1. The International Agency for Research on Cancer. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue.* Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al, eds. 4th ed. World Health Organization; 2008.
2. Leirman E, Cools J. Recent breakthroughs in the understanding and management of chronic eosinophilic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(9):1295-1304.
3. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics.* 3rd ed. Wiley-Blackwell; 2009.
4. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.
5. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
6. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
8. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual.* 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
9. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Адрес Авторизованного Представителя
Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Висбаден, Германия
Т. +49-6122-580

Vysis LSI PDGFRB FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5, 491, 224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, приписанного [1]Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

©2010, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июнь 2020
30-608486/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

UroVysion
Bladder Cancer Kit

en

REF 02J27

30-608385/R8

UroVysion
Bladder Cancer Kit
REF 02J27
30-608385/R8

Используемые символы

	Официальный производитель
	Номер списка
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Количество достаточно для <n> тестов
	Температурный режим
	Биологический риск
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. инструкцию по применению
	Использовать до (срок годности)
	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

(Номер партии 30-161070, кат. номер 02J27-025;
Номер партии 32-161070, кат. номер 02J27-020;
Номер партии 36-161070, кат. номер 02J27-095;
Номер партии 37-161070, кат. номер 02J27-099).

ЗАПАТЕНТОВАННОЕ НАЗВАНИЕ

Набор для идентификации рака мочевого пузыря

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ

Реагенты для проведение флуоресцентной гибридизации in situ

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для идентификации рака мочевого пузыря UroVysion (UroVysion Kit) предназначен для выявления анеуплоидии хромосом 3, 7, 17 и потери локуса 9p21c методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в образцах мочи у пациентов с гематурией, с подозрениями на рак мочевого пузыря. Полученные результаты набором UroVysion предназначены для использования в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сочетании с существующими стандартными диагностическими процедурами, а не вместо их, в качестве помощи для диагностики рака мочевого пузыря у пациентов с гематурией и последующего наблюдение за рецидивом опухоли у пациентов с ранее с диагностированным раком мочевого пузыря.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

По последним оценкам в 2010 году 70 530 новых случаев рака мочевого пузыря диагностирован в Соединенных Штатах (52 810 среди мужчин и 18 170 среди женщин). Рак мочевого пузыря, четвертый по распространенности рак, встречается в 3 раза чаще у мужчин, чем у женщин в США. За этот же период ожидается приблизительно 14 680 смертей (10 410 среди мужчин и 4270 среди женщин) от рака мочевого пузыря. Рак мочевого пузыря редко диагностируется у лиц моложе 40 лет.

Поскольку медиана возраста для выставления диагноза составляет 65 лет, сопутствующие заболевания часто принимаются во внимание при наблюдении за пациентами. Девяносто процентов случаев рака мочевого пузыря классифицируются как переходно-клеточный рак (ПКР), в то время как оставшиеся 10% - преимущественно плоскоклеточный рак или аденокарцинома. Есть 4 клинически значимых подгруппы ПКР, как определено патологической классификацией: карцинома in situ (pTIS), неинвазивный папиллярный ТСС (pTa), минимально инвазивные ТСС (pT1) и мышечно-инвазивные опухоли (PT2-pT4). Каждая подгруппа отличается по клиническому течению. В презентациях 75% опухолей являются «поверхностными» (т.е. pTa, pT1 или pTIS), из которых от 50 до 80% будут иметь одно или несколько повторений, и 15-25% будут прогрессировать как инвазивные опухоли. По этой причине пациенты с «поверхностным» раком мочевого пузыря регулярно контролируется на предмет рецидива и прогрессирования опухоли с цистоскопией и иногда цитологией мочи. Цистоскопическое обследование мочевого пузыря, и часто цитология мочи, также являются стандартным методом обследования для пациентов старше 40 лет с гематурией.

Ряд исследований, однако, показали, что цитология мочи имеет низкую чувствительность для выявления рака мочевого пузыря, а также необходимы улучшенные лабораторные тесты для выявления рака мочевого пузыря. Недавние исследования показали, что анализ FISH на анеуплоидию определенных хромосом может быть полезным для выявления рака мочевого пузыря.

ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Флуоресцентная гибридизация in situ - это метод, позволяющий визуализировать специфические нуклеотидные последовательности в популяции клеток.

В частности, метод FISH включает в себя точный отжиг однонитевой, флуоресцентной меченой ДНК-пробы, комплементарной таргетному региону. Гибридизация зонда с клеточной ДНК видна путем прямой детекции с использованием флуоресцентного микроскопа. UroVysion проба представляет собой флуоресцентно- меченные последовательности нуклеиновых кислот для проведения гибридизации in situ на образцах мочи, фиксированных на предметных стеклах.

Набор UroVysion состоит из смеси 4 меченых флуоресцентно зондов, содержащих сиквенсовые последовательности, гомологичных специфическим регионам на хромосомах 3, 7, 9 и 17.

Смесь зондов UroVysion состоит из следующих проб: зонд (CEP) 3 SpectrumRed, CEP 7 SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua и локус-специфическая проба (LSI) 9p21 SpectrumGold. Зонды предварительно смешивают и предварительно денатурируют в буфере для гибридизации для простоты использования.

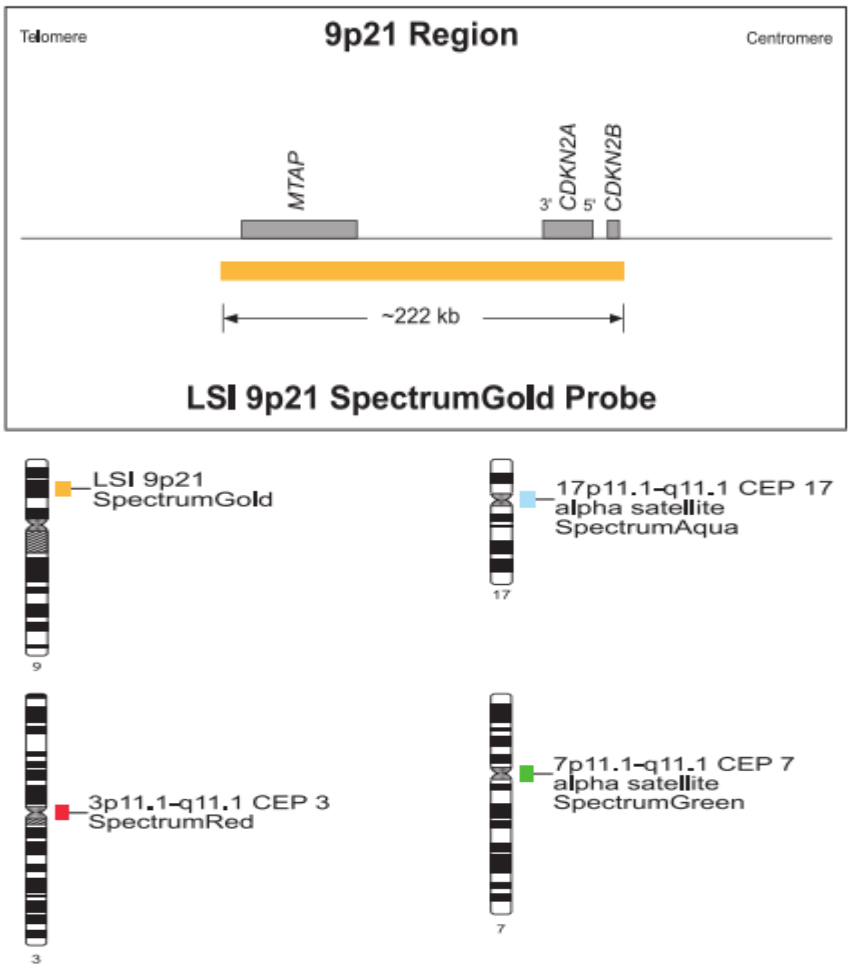
Немеченая блокирующая ДНК также включена в зонды для подавления последовательности, содержащиеся в целевых локусах, которые являются общими с другими хромосомами. При гибридизации и визуализации эти зонды дают информацию о количестве копий хромосом при подсчете количества хромосом. Набор UroVysion предназначен для обнаружения и количественного определения хромосом 3, 7 и 17 и локуса 9p21 в образцы мочи человека методом FISH.

Клетки, извлеченные из гранул мочи, фиксируют на предметных стеклах. ДНК денатуририруют до одноцепочечной формы, что в последствие позволяет гибридизоваться с зондом UroVysion.

После гибридизации несвязанный зонд удаляется серией промывок, а ядра окрашивается конткрасителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндолом), специфичным для ДНК пятно, которое флуоресцирует синий. Гибридизация зонда UroVysion рассматривается с использованием флуоресцентного микроскопа, оснащенного соответствующими фильтрами возбуждения и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

эмиссии, позволяющие визуализировать интенсивный красный, зеленый, голубой, и золотые флуоресцентные сигналы.
Подсчет CEP 3, 7 и 17 и LSI 9p21 сигналов проводят при микроскопическом исследовании ядра.



РЕАГЕНТЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Поставляемые реагенты:

Этот набор содержит достаточное количество реагентов, достаточное примерно для 20 или 100 анализов (в зависимости от каталожного номера).

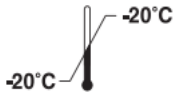
1) Смесь ДНК-зондов UroVysion
Номер партии: 30-171070 (20 тестов); 36-171070 (100 тестов)
Количество: 60 мкл (20 тестов); 300 мкл (100 тестов)
Условия хранения: -20°C в темном месте
Состав: Флуорофор-меченые ДНК-зонды для хромосом 3, 7 и 17, и локуса 9p21 в буфере для гибридизации. Буфер гибридизации состоит из декстрана сульфата, формамида и SSC.

2) DAPI II Контркраситель
Номер партии: 30-804841 (20 тестов); 30-804941 (100 тестов)
Количество: 300 мкл (20 тестов); 1000 мкл (100 тесов)
Условия хранения: -20°C в темном месте
Состав: DAPI 125 нг / мл (4,6-диамидино-2-фенилиндол) в 1,4-фенилендиамин, глицерин и буфер

3) NP-40
Номер партии: 30-804820
Количество: 4 мл (2×2 мл)
Хранение: -20°C до 25°C
Состав: NP-40 (неионный детергент)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4) 20× SSC
Номер партии: 30-805850
Количество: 66 г довести 250 мл 20×SSC раствора
Хранение: -20°C до 25°C
Состав: хлорид натрия, цитрат натрия



Храните неоткрытый комплект UroVysion при -20 ° C, в защищенном от света и влажности месте. 20X SSC и NP-40 могут храниться отдельно при комнатной температуре. Срок годности для каждого из неоткрытых компонентов указаны в индивидуальной упаковке. Эти условия хранения применяются как к открытых, так и для неоткрытых компонентов упаковки.
Следует избегать воздействия света, тепла или влажности, что может повлиять на срок годности некоторых компонентов комплекта. Компоненты, хранящиеся в условиях, отличных от указанных на этикетках, могут работать неправильно, что может отрицательно повлиять на результаты анализа.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Лабораторные реагенты

Примечание: если условия хранения не указаны на вкладке, храните реагенты в соответствии с рекомендациями поставщика.

- ProbeChek UroVysion контрольные слайды, номер лота 32-805070 / каталожный номер 02J27-011 и номер лота 32-805070, каталожный номер 02J27-010. Три предметных стекла, содержащие как положительный контроль. 20так и отрицательный контроль на одном и том же слайде (то есть, 2 целевые области на слайд - 1 негативный, 1 позитивный). Негативный контроль приготовлен из фиксированной культивируемой нормальной клеточной линии лимфобластов человека (GM11854); положительный контроль приготовлен из фиксированной, культивируемой клеточной линия карциномы рака мочевого пузыря (UM-UC-3). Хранить контрольные слайды при -20 ° C в закрытом контейнере с поглотителем влаги, для защиты от влажности.
- Vysis FISH реагент для пробоподготовки (номер лота 32-801270)/ каталожный номер 02J03-032), который включает:
- Vysis Протеаза (3×50 мл)
  Активность фермента 1:3000 к 1:3500

Примечание: Пепсин расщепляет не менее 3000 и не более 3500 за раз коагулированного яичного альбумина.

- Vysis Буфер для пепсина (3×50 мл)
  10 mM HCl
- Vysis PBS (2×250 мл)
  1× Фосфатный буферный раствор
- Vysis 100×$MgCl_2$ (3×0.5 мл)
  2M $MgCl_2$
- Vysis 20×SSC (66 г)
- 10% нейтральный забуференный формалин
- Фиксатор Карнуа (3:1) метанол: ледяная уксусная кислота). Ежедневно готовить свежий раствор.
- Иммерсионное масло для соответствующего микроскопа. Хранить при комнатной температуре (15°C до 30°C)
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированная (12N) HCl
- 1N NaOH
- Высокоочищенная вода (Milli-Q). Хранить при комнатной температуре.
- Клей
- Высокоочищенный формамид

<u>Хранение образцов</u>

- Карбовакс (2% полиэтиленгликоль в 50% этаноле). Рекомендуемый производитель: Sigma-Aldrich.
- ThinPrep PreservCyt Solution, Hologic (Cytyc) Corp.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Лабораторное оборудование

• Стеклянные покровные стекла (рекомендуются 12 мм круглые и 18 мм квадратные стеклянные покровные стекла)
• 12-луночные, 6-миллиметровые круглые предметные стекла. Рекомендуемый тип: Шандон
• Дозаторы (от 1 до 10 мкл и от 20 до 200 мкл) и стерильные наконечники
• Конические центрифужные пробирки (15 и 50 мл)
• Таймер (±1 секунда)
• Магнитная мешалка
• Вортекс
• Микроцентрифуга
• Настольная центрифуга
• Мерный цилиндр
• Водяные бани (37±1°C и 73±1°C)
• Увлажненный бокс для гибридизации
• Инкубатор (37±1°C)
• Щипцы
• Одноразовый шприц (5 мл)
• Сосуды Коплина (10) Предлагаемый тип: Wheaton № 900570
Эпифлуоресцентный микроскоп, оснащенный 100-ваттной ртутной лампой и рекомендуемые фильтры к нему (желтый одиночный, аква одиночный, DAPI однополостный, и зеленый/красный широкополостные фильтры)
• Фазоконтрастный микроскоп с объективом 20X
• pH-метр и лакмусовая бумага
• Калиброванный термометр
• 0,45 мкм поры для фильтрации
• осушитель
• Параметры автоматического коденатурационного анализа:
• Система HYBrite - обратитесь к руководству пользователя для получения инструкций.
• Система ThermoBrite - см. Системное руководство пользователя.
• Опция автоматического анализа перед обработкой:
• Процессор VP 2000 - см. Системное руководство для инструкции пользователя

Микроскоп и аксессуары

Микроскоп: Требуется эпифлуоресцентный микроскоп с освещением для оценки результатов гибридизации. Если существующая флуоресценция не видна на микроскопе, его следует проверить, чтобы убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальный просмотр флуоресценции образцов для анализа гибридизации. Микроскоп, используемый с общей ДНК, окрашенной такими красителями как DAPI, пропидий йодид и хинакрин, могут не работать адекватно для FISH-анализа. Рекомендуется регулярная очистка микроскопа и периодическое профилактическое обслуживание техническим представителем производителя.
ПРИМЕЧАНИЕ: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Источник света возбуждения: лампа возбуждения является источником света, что это возбуждает флуорофоры для последующей флуоресценции. Если лампа возбуждения находится в неправильном положении, оптимальное изображение не будет сгенерировано. Рекомендуется использовать ртутную лампу с максимальным сроком службы около 200 часов в качестве источника возбуждения. Запишите, сколько часов отработала лампа и замените лампу, прежде чем она превысит номинальное время.
Обьективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для подсчета сигналов Urovysion теста и получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое с целью погружения в масло должны быть сформулированы для низкой автофлуоресценции и специально для использовать в флуоресцентной микроскопии.
Фильтры: наборы фильтров для флуоресцентного микроскопа, оптимизированные для использования с CEP и LSI и доступны у Abbott Molecular для большинства моделей микроскопов. Рабочие характеристики UroVysion.
Анализ с использованием других фильтров должен быть определен и подтвержден пользователем. Эксплуатационные характеристики анализа Уровижин при работе с другими фильтрами должны быть установлены и валидированы пользователем.
Рекомендуемые наборы фильтров для UroVysion – желтый одиночный, аква одиночный, DAPI одиночный и зеленый/красный двойной. Гибридизация LSI 9p21 и CEP 3, 7, и 17 зондов с таргетными регионами отмечены золотым, красным, зеленым, и аква цветом флуоресценции, соответственно. Ядерная ДНК будет флуоресцировать синим при окраске DAPI.

Приготовление рабочих растворов реагентов

1% Раствор формальдегида

Смешайте:

12,5 мл	10% нейтрального забуференного формалина
37 мл	1×X PBS очищенной воды
0,5 мл	100×X $MgCl_2$ (1 пробирка из набора Vysis FISH реагент для пробоподготовки)
50 мл	Финальный объем

Тщательно перемешайте. Перелейте раствор в сосуды Коплина. Утилизируйте раствор по истечению недели. Хранить неиспользуемый раствор при температуре от 2°C до 8°C в течении 6 месяцев.

20X SSC (3M хлорид натрия, 0,3M цитрат натрия, pH 5,3)

Приготовить 20X SCC pH 5,3, смешайте:

66г	20X SSC
200 мл	очищенной воды
250	мл общий объем

Тщательно перемешать. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Доведите pH до 5,3 с помощью концентрированной HCl. Довести общий объем до 250 мл добавив очищенную воду. Фильтруют через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Хранить при комнатной температуре до 6 месяцев.

Раствор для денатурации (70% Формамид/2X SSC pH 7,0–8,0)

ПРИМЕЧАНИЕ: Не для автоматизированного (HYBrite или ThermoBrite) коденатурационного анализа.

Для приготовления денатурационного раствора смешайте:

49 мл	Формамида
7 мл	20× SSC pH 5,3
14 мл	Очищенная вода
70мл	общий объем

Тщательно перемешайте. Измерьте pH при комнатной температуре, используя лакмусовые бумажки, убедитесь, что pH составляет от 7,0 до 8,0. Приготовленный раствор может использоваться в течении недели. Проверяйте pH перед каждым использованием. Хранить при температуре от 2 до 8 ° C в плотно закрытом контейнере, если он не используется.

Спиртовые растворы для промывки

Приготовьте разведения спиртов 70%, 85%, используя 100% этанол и очищенную воду. Данные разведения могут использоваться в течение 1 недели, если не происходит испарение или раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

становится разбавленным из-за чрезмерного использования. Хранить при в комнатной температуре в плотно закрытых емкостях, если они не используются.

0.4X SSC/0.3% NP-40

Для приготовления смешайте:

20 мл	20× SSC pH 5,3
877 мл	Очищенная вода
3 мл	NP-40
1000мл	общий объем

Тщательно перемешать. Измерьте pH при комнатной температуре, используя pH-метр. Доведите pH до 7,5±0,2 с помощью 1N NaOH. Доведите объем до 1 литра с помощью очищенной воды. Пропустите через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Утилизируйте использованный раствор в конце каждого дня. Храните неиспользованный раствор при комнатной температуре до 6 месяцев.

2X SSC/0.1% NP-40

Для приготовления смешайте:

1000 мл	20× SSC pH 5,3
849 мл	Очищенная вода
1 мл	NP-40
1000мл	общий объем

Тщательно перемешать. Измерьте pH при комнатной температуре, используя pH-метр. Доведите pH до 7,5±0,2 с помощью 1N NaOH. Доведите объем до 1 литра с помощью очищенной воды. Пропустите через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Утилизируйте использованный раствор в конце каждого дня. Храните неиспользованный раствор при комнатной температуре до 6 месяцев.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

IVD ПРЕДНАЗНАЧЕНО ДЛЯ ДИАГНОСИКИ IN VITRO

1. Для диагностики in vitro.
2. Со всеми биологическими образцами следует обращаться как с потенциальными источниками инфекционных агентов. Контрольные препараты из этого набора изготовлены из клеточных линий человека, фиксированных в растворе Карнуа. *Часто невозможно убедиться в инфекционной безопасности образца, поэтому со всеми образцами человека и контрольными препаратами следует обращаться, соблюдая универсальные меры предосторожности. Руководство по обращению с такими образцами можно получить в Центрах контроля и профилактики заболеваний США.*
3. Условия гибридизации могут изменяться при использовании других реагентов, кроме реагентов, поставляемых Abbott Molecular Inc.
4. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и детекции может привести к получению неприемлемых или неправильных результатов.
5. Флуорофоры быстро распадаются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Это относится и ко всем этапам работы с гибридизованными препаратами. Проводите все манипуляции, не требующие света (инкубация, промывка и т.д.), в темноте.
6. Набор содержит формамид, являющийся тератогеном. Не допускайте его контакта с кожей и слизистыми.
7. Измерение температуры растворов, водяных бань и инкубаторов следует проводить градуированными термометрами, т.к. температура является критической при выполнении анализа.
8. Все опасные материалы следует утилизировать в соответствии с местными и государственными правилами.

UroVysion смесь ДНК-зондов

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

UroVysion смесь ДНК-зондов

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360D	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

NP-40

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки:

H302	Опасно при проглатывании
H318	Вызывает повреждения глаз
H412	Вызывает вредные воздействие для водных организмов с долгосрочными последствиями
P280	Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, защиту для глаз
P264	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P273	Избегайте попадания в окружающую среду.
P305+	При попадании в глаза: Тщательно промойте водой в течении нескольких минут.
P351+	Снимите контактные линзы, если они есть и продолжайте промывать.
P338	
P301+P312	При проглатывании: Позвоните в центр токсикологии или врачу при плохом самочувствии
P501	Материалы или контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом.

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

СБОР ОБРАЗЦОВ И ТРАНПОРТИРОВКА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

UroVysion Kit предназначен для использования на образцах мочи. Выполните сбор мочи (≥33 мл) в кабинете врача. Смешайте мочу в отношении 2:1 с консервантом; Карбовакс (2% полиэтиленгликоль в 50% этаноле) или консерванты PreservCyt согласно рекомендациям. Перенесите в центрифужную пробирку(и) емкостью 50 мл или другой плотно закрытый пластиковый контейнер. Использование любого другого консерванта должно быть валидировано лабораторией. Если моча будет доставлена в лабораторию не сразу после сбора, поставьте ее в холодильник немедленно и отправьте в лабораторию в течение 24 часов.
Предпочтительные условия хранения и доставки на пакетах со льдом, но образцы могут храниться и доставляться при температуре до 25°C. Было показано, что моча, хранящаяся в Carbowax или PreservCyt стабильна в течение 1 недели; однако рекомендуется, что образцы должны быть обработаны до фиксированных клеточных гранул (см. обработка образцов, шаг 7) в течение 72 часов с момента сбора. Аналитические характеристики теста UroVysion при любых других условиях должны быть определены и подтверждены пользователем.

ПОДГОТОВКА И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Обработка образцов
1. Отцентрифугируйте мочу в центрифужной пробирке 50 мл при 600 g в течение 10 минут при комнатной температуре (от 15 до 30°C).
2. Удалите супернатант, оставив примерно от 1 до 2 мл клеточного осадка, стараясь не зацепить осадок.
3. Ресуспензировать осадок в оставшихся 1-2 мл супернатанта и перенести содержимое в коническую центрифужную пробирку объемом 15 мл. Промыть в 50 мл пробирке с 10 мл 1XPBS и перенести содержимое в 15 мл пробирку.
Примечание: осадки образца одного и того же пациента могут быть объединены.
4. Центрифугировать образец (ы) при 600 г в течение 10 минут при комнатной температуре.
5. Удалите супернатант в пределах примерно от 0,5 мл от клеточного осадка.
6. Ресуспендируйте осадок в оставшихся 0,5 мл супернатанта. Медленно по каплям добавьте от 1 до 5 мл свежего фиксатора (3:1, метанол: уксусная кислота) слегка помешивая.
7. Оставьте фиксированные образцы при -20 ° C в течение минимум 30 минут.
Примечание: образцы могут храниться в течение ночи или дольше (до 10 дней) на этом этапе.
8. Центрифугировать образец(ы) при 600 г в течение 5 минут при комнатной температуре. Тщательно удалите супернатант.
Примечание: если осадок не виден или едва виден, дальнейшая промывка осадка не рекомендуется во избежание потери клеток. Вместо этого перейдите к шагу 11. если образец был сохранен в течение ночи или дольше, ресуспензируют в свежем фиксаторе до подготовки слайдов.
9. Промойте осадок путем ресуспензирования в 1-5 мл фиксатора.
10. Центрифугируйте образец(ы) при 600 g в течение 5 минут при комнатной температуре.
Повторите шаги 8 и 9 дважды.
11. После центрифугирования зафиксируйте суспензии клеток в фиксаторе:
• Если клеточного осадка очень мало и он плохо виден, ОСТОРОЖНО удалите как можно больше фиксатора, оставив примерно 100 мкл раствора.
• Если клеточный осадок хорошо виден, удалите как можно больше фиксатора и добавьте 0,5-1 мл свежего фиксатора к клеточному осадку.
12. Немедленно продолжите процедуру подготовки слайдов.

Подготовка слайдов
Используйте 12-луночные слайды.
1. Ресуспензируйте клеточный осадок и нанесите 3 мкл, 10 мкл и 30 мкл суспензии клеток по кругу на 3 слайда (круг № 1, 2 и 3).
2. Дайте образцам высохнуть.
3. Оцените предметные стекла под фазово-контрастным микроскопом, используя 20X увеличение.
4. Выберите область гибридизации (обведите круг № 1, 2 или 3), в котором от ~100 до 200 клеток видны в поле зрения. Круг, который лучше всего соответствует рекомендуемой плотности клеток (т.е. от 100 до 200 клеток на поле) следует использовать для гибридизации с зондом UroVysion.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Если плотность клеток слишком низкая, даже в круге № 3, нанесите 30 мкл клеточной суспензии на круге № 3. Высушите образец и рассмотрите под фазово-контрастным микроскопом, повторить если необходимо.
• Если плотность клеток слишком высокая, даже в круге № 1, разбавьте образец с фиксатором и повторите шаги с 1 по 4.

Примечание: если присутствует чрезмерное количество дебриса, следуйте процедуре предварительной обработки, а затем выберите область гибридизации.

5. Подготовьте как минимум 1 дополнительный резервный слайд, следуя шагам с 1 по 4, описанным выше. Хранить дополнительные слайды при температуре -20°C в коробке с увлажнителем.

Примечание: Фиксированные предметные стекла стабильны при -20°C до 12 месяцев. Хранение любой оставшейся клеточной суспензии при -20°C до 1 месяца в случае подготовки дополнительных слайдов при необходимости.

Предварительная обработка слайдов

Слайды должны быть предварительно обработаны и зафиксированы перед анализом с помощью UroVysion набора. Вкладыши внутри упаковки для набора по предварительной обработке FISH (номер партии 32-801270 /Каталожный номер № 02J03-032) содержит подробные инструкции.

Ручной анализ предподготовки	**Оптимально автоматизированный анализ предподготовки**
• Оставьте высыхать слайды при комнатной температуре	• Слайды должны полностью высохнуть при комнатной температуре
• Погрузите слайд(ы) в 2X SSC на 2 минуты (от 2 до 2,5 мин) при 73±1°C.	• Погрузите слайды в 2X SSC на 2 минуты (от 2 до 2,5 мин.) при 73±1°C
• Погрузите слайды в раствор протеазы на 10 минут (±1 минута) при температуре 37±1°C	• Погрузите слайды в раствор протеазы на 10 мин. (±1 мин.) при 37±1°C
• Промойте слайды в 1×PBS в течении 5 минут (±1 минута) при комнатной температуре	• Промойте слайды в 1X PBS в течении 5 минут (±1 мин.) при комнатной температуре
• Зафиксируйте слайды в 1% формальдегиде в течении 5 мин. (±1 мин.) при комнатной температуре	• Зафиксируйте слайды в 1% формальдегиде в течении 5 мин. (±1 мин.) при комнатной температуре
• Промойте слайды в 1X PBS в течении 5 мин. (±1 мин.) при комнатной температуре	• Промойте слайды в 1X PBS в течении 5 мин. (±1 мин.) при комнатной температуре
• Проведите дегидратацию слайдов путем помещения слайдов в 70% этанол при комнатной температуре. Слайды должны побыть в растворе этанола по крайней мере в течении 1 минуты. Повторите тоже самое, опустив слайды в 70% этанол и затем в 100% этанол.	• Проведите дегидратацию слайдов путем помещения слайдов в 70% этанол при комнатной температуре. Слайды должны побыть в растворе этанола по крайней мере в течении 1 минуты. Повторите тоже самое, опустив слайды в 70% этанол и затем в 100% этанол.
• Слайды должны полностью высохнуть	• Высушите слайды при 25°C в течении 3 минут или пока слайды полностью не высохнут.
• Продолжить работу с протоколом анализа для теста UroVysion	• Продолжить работу с протоколом анализа для теста UroVysion

ПРОЦЕДУРА FISH-АНАЛИЗА

UroVysion-тест

Для ручного анализа (Для опционально автоматизированного (HYBrite или ThermoBrite) анализа коденатурации, см. информацию ниже).

ПРИМЕЧАНИЕ: Время для приготовления раствора зонда (см. Подготовка зонда, шаги 1-3) должны быть тщательно скоординированы с денатурацией ДНК-образца (шаг 1-7), поэтому эти два шага должны быть выполнены в одно и тоже время.

Денатурация ДНК-образца:

1. Предварительно прогреть увлажненную гибридизационную камеру (герметичный контейнер с влажной промокательной бумагой или бумажным полотенцем приблизительно 1 дюйм ×3 дюйма (приклеенный к боковой стороне контейнера) до 37±1°C путем помещения в инкубатор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

при 37±1°C до подготовки слайдов. Увлажнить промокательную бумагу или бумажное полотенце водой перед каждым использованием в гибридизационной камере.

2. Добавьте денатурирующий раствор в сосуд Коплина и поместите в воду с температурой 73±1°C

не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 73±1°C. Проверьте температуру раствора перед использованием.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если раствор хранится при температуре от 2 до 8°C, дайте раствору в сосуде Коплина достигнуть комнатной температуры перед помещением в водяную баню.

3. Денатурировать ДНК образца путем погружения подготовленных слайдов в денатурирующий раствор при 73±1°C (4 предметных стекла на сосуд) в течение 5 минут

(±1 мин). Не денатурируйте более 4 слайдов за один раз в сосуде Коплина; если денатурируете менее 4 слайдов, заполните пустое место дополнительным слайдом.

Примечание: Проверьте температуру раствора внутри сосуда Коплина перед каждым использованием.

4. Используя пинцет, удалите слайд(ы) из денатурирующего раствора и сразу же поместите в моющий раствор 70% этанола при комнатной температуре. Перемешайте слайд, чтобы удалить формамид. Слайд(ы) должны побыть в этаноле в течение 1 минуты.

5. Извлеките слайд(ы) из 70% этанола. Повторите шаг 4 с 85% этанолом, затем со 100% этанолом.

6. Удалите излишки этанола со слайда, коснувшись нижнего края слайда промокательной бумагой и вытрите нижнюю сторону слайда насухо лабораторной салфеткой.

7. Высушите предметное стекло (-а) на нагревателе для предметного стекла от 45 до 50 ° C в течение не более 2 минут.

Подготовка зонда

1. Извлеките ДНК-зонд UroVysion из холодильника на -20°C и дайте нагреться до комнатной температуры. Перемешайте на Vortexe. Отцентрифугируйте флаконы аккуратно на микроцентрифуге от 1 до 3 секунд) в, чтобы содержимое пробирки осталось на дне. Снова перемешайте на вортексе.

2. Прогрейте раствор ДНК-зонда UroVysion в течение 5 минут при температуре 73±1°C на водяной бане.

3. Поместите раствор зонда на нагреватель для предметного стекла от 45 до 50°C.

Гибридизация

1. Нанесите 3 мкл раствора зонда на выбранную целевую область предметного стекла. Сразу же, поместите 12 мм стеклянное покровное стекло поверх зонда. Осторожно прижмите покровное стекло, чтобы позволить раствору зонду равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха будут мешать гибридизации и поэтому их следует избегать. Оставшийся раствор зонда должен быть немедленно возвращен на хранение при -20°C после использования.

2. Заклейте покровное стекло с помощью резинового клея следующим образом: наберите клей в 5 мл шприц. Нанести небольшое количество резинового клея вокруг периферии покровного стекла, накрывающей покровное стекло и слайд, образуя печать вокруг покровного стекла.

3. Поместите слайды в предварительно нагретую увлажненную камеру гибридизации. Накройте камеру плотной крышкой и инкубируйте при 37 ±1°C в течение ночи (примерно 16 часов).

4. Перейдите к Промывки после гибридизации.

Опциональная автоматизированная (HYBrite или ThermoBrite) процедура коденатурации.

Подготовка и применение зонда

1. Извлеките пробу UroVysion из морозильника на -20° C и дайте

Прогреться при комнатной температуре (от 15 до 30°C). Перемешайте на вортексе. Отцентрифугируйте осторожно на центрифуге (от 1 до 3 секунд) в микроцентрифуге для того, чтобы содержимое флакона переместилось на дно. Аккуратно отвортексируйте снова.

2. Нанесите 3 мкл раствора зонда на выбранную целевую область предметного стекла. Сразу же, поместите 12 мм круглое стеклянное покровное стекло поверх зонда.

Осторожно прижмите покровное стекло, чтобы позволить раствору зонда равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха будут мешать гибридизации и их следует избегать. Раствор зонда должен быть немедленно возвращен на хранение при -20°C после использования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Запечатайте покровное стекло резиновым клеем следующим образом: наберите клей в 5 мл шприц. Нанести небольшое количество резинового клея вокруг периферии покровного стекла, накрывающей покровное стекло и слайд, образуя печать вокруг покровного стекла.

Денатурация ДНК образца и гибридизация в системе HYBrite:

1. Смочите бумажное полотенце водой и поместите полотенце в каналы вдоль поверхности нагрева.
2. Включите инструмент HYBrite.
3. Установите программу для температуры плавления 73°C и времени плавления 2 минуты (денатурация) и температура гибридизации 39°C и время гибридизации от 4 до 16 часов.
4. При появлении запроса поместите предметные стекла на нагревательную поверхность прибора. Дополните пустыми стеклянными предметными стеклами по мере необходимости. Убедитесь, что слайды лежат на нагревательной поверхности.
5. Закройте крышку HYBrite и запустите программу.

Денатурация ДНК образца и гибридизация на Системе ThermoBrite:

1. Вставьте 2 карты влажности в слоты на крышке устройства. Увлажните каждую карту 8-10 мл дистиллированной или деионизированной водой. *Обратитесь к Руководству по эксплуатации ThermoBrite для повторного использования карт влажности при последующих прогонах.*
2. Включите устройство ThermoBrite.
3. Установите программы температуры денатурации 76°C и время денатурации 3 минуты. (денатурация) и температуры гибридизации 39°C и время гибридизации от 14 до 18 часов (гибридизация).
4. При появлении запроса поместите предметные стекла на нагревательную поверхность прибора. Убедитесь, что слайды лежат ровно и упираются в отмеченные места, предназначенные для слайдов.
5. Закройте крышку ThermoBrite и запустите программу.

Постгибридизационные промывки (Ручная т автоматическая программы)

1. За тридцать минут до отмывки заполните сосуд Коплина 0,4X SSC/0,3% NP-40 и поместите в водяную баню при температуре 73±1°C. Используя откалиброванный термометр, проверьте температуру раствора внутри сосуда перед добавлением слайдов для процедуры отмывки. Температура растворов должна составлять 73±1°C.
2. Заполните второй сосуд 2X SSC/ 0,1% NP-40 и поместите при комнатной температуре.
Утилизируйте оба моющих раствора после 1 дня использования.
3. Удалите резиновый клей и покровное стекло с предметных стекол.

Примечание: Удалите резиновый клей и покровное стекло с 1 предметного стекла на время и поместите сразу в сосуд Коплина с 0,4X SSC/0,3% NP-40.

4. Поместите стекла в 0,4X SSC/0,3% NP-40 сразу после снятие покровного стекла. Когда все слайды находятся в сосуде (максимум из 4) инкубировать в течение 2 минут при 73±1°C. Не промывайте больше, чем 4 слайда одновременно в одном сосуде; дополните пустым стеклом при необходимости.

Примечание: размещение отдельного слайда в сосуде не должно превышать нескольких секунд; если это так, то убедитесь, что слайд не находится в промывочном буфере более 2 минут. После удаление слайдов, необходимо, чтобы температура вернулась к 73±1°C, прежде чем начать промывать больше слайдов.

5. Через 2 минуты удалите стекло (а) из промывочного раствора и поместите стекло (а) в сосуд Коплина, содержащий 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре. Инкубировать от 5 секунд до 1 минуты.
6. Достаньте стекла с промывочного раствора и поместите вертикально в темное место (например, ящик) на бумажное полотенце, чтобы они полностью высохли.
7. Нанесите 10 мкл DAPI II на целевую область и поместите покровное стекло (рекомендуется 18 мм) над раствором DAPI II, избегая образования пузырьков воздуха. Храните слайды в темноте до подсчета сигналов.

Хранение слайдов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранить гибридизированные стекла (с покровными стеклами) при -20°C в темноте. После удаление из -20°C, дайте стеклу(ам) достичь комнатной температуры до просмотра с помощью флуоресцентного микроскопа.

Интерпретация результатов

Сигналы зонда UroVysion и конткрасителя DAPI следует просматривать с использованием следующих фильтров:

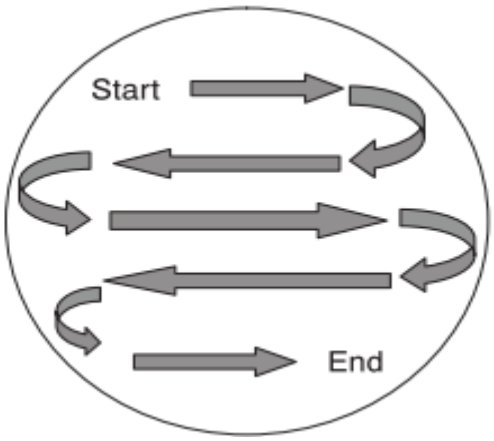
• DAPI одиночный
• Аква одиночный (хромосома 17)
• Желтый (Золотой) одиночный (локус 9p21)
• Красный/Зеленый двойной (хромосомы 3 и 7)

Настоятельно рекомендуется использовать эпифлуоресцентный микроскоп, оснащенный 100-ваттной ртутной лампой. Использование контркрасителя DAPI вызывает окрашивание ядер и флуоресценцию ярко-синего цвета.

Анализ образцов слайдов

1. Используйте предписанные фильтры (см. выше) и увеличение 400X для сканирования (от 600X до 1000X для анализа, см. шаг 5 ниже).
2. Отрегулируйте глубину фокуса и ознакомьтесь с размером и формой целевых сигналов и шумов (дебрис).
3. Начните анализ в верхнем левом квадранте целевой области. Сканирование поля слева направо и сверху вниз, без повторного сканирования той же области (см. диаграмму ниже).

Примечание: На слайде имеется примерно от 70 до 80 полей обзора.

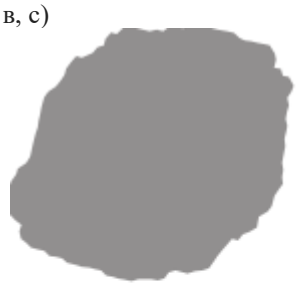
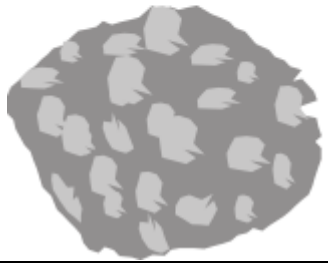
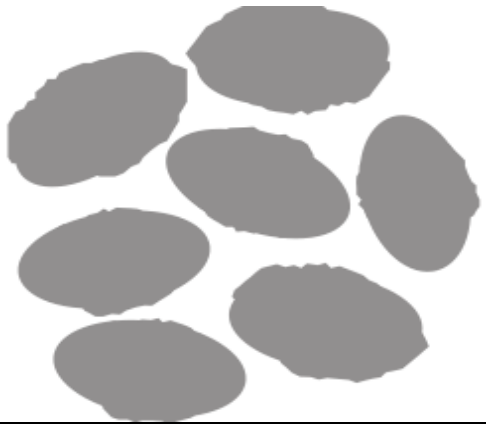


4. Используйте следующие критерии (см. Рисунок 1), чтобы выбрать подозрительные клетки злокачественных новообразований (морфологически аномальных):

а. большой размер ядра
б. неправильная ядерная форма
с. «пятнистое» окрашивание DAPI
д. кластеры клеток (не считайте перекрывающиеся клетки в кластерах)

Примечание: начните с тех клеток, которые появляются морфологически аномальными. Если присутствует несколько морфологически аномальных клеток, выберите самые большие клетки или те, где самые большие ядра. Если морфологически аномальные клетки не легко выявить, весь образец должен быть отсканирован и ядра в большинстве морфологически аномальных клетках должны быть засчитаны первыми.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Норма: не считать	Одиночная клетка
	2 перекрывающиеся клетки
Подозрение на злокачественность: Подсчитывать	Атипичная ядерная морфология (a, в, c)  
	Кластеры клеток (d) 

5. Поменяйте увеличение от 600X до 1000X. Перемещайте фокус вверх и вниз, чтобы найти все сигналы, присутствующие в ядре.

6. Определите количество сигналов для всех 4 проб в 25 морфологически атипичных клетках *# используя фильтры, перечисленные выше (см. рисунки 2, 3 и 4).

7. Запишите хромосомный паттерн, только если:

• имеется усиление (т. е. 3 или более сигналов) от 2 или более хромосом 3 (красный), 7 (зеленый) или 17 (аква), или

• есть потеря обеих копий LSI 9p21.

Если хромосомы 3, 7 или 17 показывают потерю обеих хромосом, считается, что клетка не может быть интерпретирована из-за сбоя гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание: если окружающие клетки показывают аномальные паттерны хромосом, как описано выше, эти клетки должны быть записаны, даже если они не являются морфологически ненормальными.

Только для Иллюстрации, не для масштабного показа		Морфологически «нормальные» клетки **Не подсчитывать**. Смотрите примечание в шаге 7 вышеизложенных исключений
		Морфологически ненормальные клетки с диплоидным набором хромосом. **Считать общее число анализируемых клеток, но не учитывать хромосомные паттерны.**
		Морфологически абнормальные клетки с абнормальным числом хромосом. **Записать число хромосом**.

*# Если морфологически аномальные клетки не всегда видны, весь образец должен быть отсканирован и ядра, представляющие большинство морфологически аномальных клеток следует оценивать в первую очередь.

8. Запишите общее количество просмотренных морфологически аномальных клеток (диплоидный и аномальный).

Примечание: хотя количество отдельных сигналов не записывается, клетки с не диплоидным числом, имеющим как минимум 1 сигнал для каждой из 4-х проб, но не соответствующим указанным критериям, в шаге 7 должны быть включены наряду с диплоидными клетками, в общем количестве морфологически аномальных просмотренных клеток.

8. Если среди 25 морфологически аномальных клеток был проведен анализ, *и встретился один из следующих критериев, остановите анализ:

≥ 4 из 25 клеток показывают увеличение для 2 или более хромосом (3, 7 или 17) в одной и той же клетке, или

≥ 12 из 25 клеток имеют нулевые 9p21сигналы.

В противном случае продолжайте анализ до тех пор, пока:

4 клетки с усилением для нескольких хромосом были обнаружены, или 12 клеток с нулевыми сигналами 9p21 были обнаружены, или пока весь образец не будет проанализирован.

#Если морфологически аномальные клетки не всегда видны, весь образец должен быть отсканирован и ядра, представляющие большинство морфологически аномальных клеток следует оценивать в первую очередь.

Анализ слайдов контроля качества

Для подсчета сигналов стекол контроля качества выполните шаги с 1 по 6, описанные выше.

Подсчитайте 25 идущих подряд клеток и запишите результаты. не выбирайте только морфологически аномальные клетки или прекратите подсчет после обнаружения 4 или 12 клеток, как описано выше.

Рисунок 2. Руководство по подсчету одноцветных сигналов

1	Не подсчитывайте, пропустите. Это может быть 2 клетки с одним сигналом в каждой или искаженные ядра.
2	Подсчитывать как два сигнала: один сигнал очень компактный и второй сигнал диффузный
3	Не подсчитывайте, пропустите. Пользователь не может определить, какая клетка содержит сигнал.
4	Считать, как два сигнала. Один сигнал разделенный.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

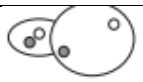
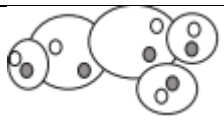
5	Считать, как три сигнала.
6	Считать как 4 сигнала.
7	Считать как три сигнала. Один сигнал разделенный.

*Считать диффузный сигнал как 1 сигнал, если диффузия сигнала в смежных и в приемлемых границах; 2 сигнала, соединенных видимой линией, считаются разделенным сигналом и должна подсчитываться как 1 сигнал. Расщепленный или диффузный сигнал может возникнуть в результате конденсации вариабельной ДНК внутри ядра, степень которой зависит от текущей стадия деления клеток; и не указывает на дополнительный набор хромосом в этой клетке.

Рисунок 3. Руководство по подсчету двухцветных сигналов

Ключ: ○ **= зеленая проба**

● **= красная проба**

1	 Не подсчитывать – ядра перекрываются и границы обоих ядер не видны.
2	Считать как один красный и один зеленый сигнал. Красный сигнал диффузный.
3	 Не подсчитывать. Ядра расположены слишком близко друг к другу, чтобы можно было определить их границы.
4	Считать как один красный сигнал и один зеленый. Красный сигнал разделенный.
5	Считать как один красный сигнал и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал разделенный и красный сигнал тоже разделенный.
6	Считать как два красных и один зеленый сигнал.
7	Считать как три красных сигнала и один зеленый сигнал.
8	Считать как четыре красных сигнала.

*Считать диффузный сигнал как 1 сигнал, если диффузия сигнала в смежных и в приемлемых границах; 2 сигнала, соединенных видимой линией, считаются разделенным сигналом и должна подсчитываться как 1 сигнал. Расщепленный или диффузный сигнал может возникнуть в результате конденсации вариабельной ДНК внутри ядра, степень которой зависит от текущей стадия деления клеток; и не указывает на дополнительный набор хромосом в этой клетке.

Рисунок 4. Примеры хромосом нормальных и абнормальных клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ключ: ○ =CEP 3 (красный) ⊗ =CEP 7 (зеленый)	● = CEP 17 (голубой) ● = LSI 9p21 (золотой)
1	Хромосомно нормальная клетка
2	Хромосомно-абнормальная клетка – увеличение по CEP 3 и CEP 17
3	Хромосомно-абнормальная клетка – потеря гетерозиготности LSI 9p21

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольные слайды должны быть запущены одновременно со стеклами пациента для мониторинга проведения анализа и оценки точности просмотра сигнала. Один контрольный слайд (1 положительная и 1 отрицательная цель на слайд) должен обрабатываться для каждого прогона образца и с каждым новым лотом. Контрольные предметные стекла должны быть гибридизованы со смесью зондов UroVysion вместе с образцами стекол для исследования.

Выполните подсчет сигнала в соответствии с инструкциями в анализе раздела контроля качества слайдов, описанных выше. Результаты подсчета сигналов должны быть внутри спецификаций в таблице данных, предоставленных с контрольными слайдами для приемлемого выполнения теста.

Если контрольные слайды не соответствуют критериям приемлемости слайдов, анализ не может быть выполнен надлежащим образом или реагенты для анализа UroVysion не были произведены надлежащим образом. Результаты теста ни в коем случае не должны учитываться, если контрольные слайды не сработали. Если контрольные слайды отвечают соответствующим критериям, но результаты теста находятся за пределами указанного диапазона, подсчет не может быть выполнен корректно, и независимо, повторение анализа одного того же слайда может быть уместно. В случае неудачи гибридизации, либо с образцом исследования, либо с контрольными слайдами, обратитесь к руководству по устранению неполадок, представленных в Таблице 1.

Для клинических образцов, когда интерпретация сигнала гибридизации представляет сложность, тест считается неинформативным. Если недостаточно клеток для анализа, тест также считается неинформативным.

Образцы пациентов должны контролироваться в соответствии со стандартными лабораторными требованиями. Качество гибридизации и подсчет должны быть задокументированы в соответствующей форме. Качество и эффективность гибридизации следует учитывать при оценке результатов.

Таблица 1 Устранение неполадок

Проблема	Возможные случаи	Пути решения
Сигнал слабый или отсутствует	• Неправильно подобраны фильтры для анализа слайдов • Микроскоп неправильно работает • Использованы несоответствующие лампы (ксеноновые или вольфрамовые) • Старая ртутная лампа • Ртутная лампа смещена • Коллекторные линзы загрязнились или треснули • Зеркало в корпусе для лампы загрязнилось или разбито • Ненадлежащие объективы	• Используйте правильные фильтры • Свяжитесь с техническим представителем фирмы-производителя микроскопа • Используйте ртутные лампы (желательно на 100 Вт) • Замените новую лампу • Откорректируйте лампу • Промойте или замените линзы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Не соблюдены условия гибридизации • Неправильные условия промывки • Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, которые затрудняют доступ для зондов • Зонды хранились неправильно	• Промойте или замените зеркало • Используйте рекомендуемые объективы • Проверьте температуру водяной бани 73±1°C • Проверьте температуру 37±2°C инкубатора • Проверьте температуру водяной бани 73±1°C • Проверьте состав водяной бани (pH, и т.д.) • Покровное стекло должно наноситься сначала путем прикосновения к поверхности гибридизационной смеси • Хранить зонды при температуре -20°C (±5°C) в темноте
Низкая специфичность сигнала	• Не соблюдены условия гибридизации • Температура промывочного раствора низкая	• Проверьте температуру 37±2°C инкубатора • Установите температуру промывочного раствора на 73±1°C
Высокий фоновый сигнал	• Плохая промывка	• Проверьте pH и температуру гибридизации • Проверьте температуру 73±1°C водяной бани • Обеспечить интенсивное помешивание во время промывки
Чрезмерно яркий сигнал	• Концентрация зонда достаточно высокая для вашего микроскопа	• Попытайтесь блокировать некоторые сигналы путем помещения фильтра с нейтральной плотностью на пути возбуждающего луча
Клеточные структуры повреждены	• Образец был чрезмерно ферментирован	• Уменьшите действие протеазы

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируется минимум 25 морфологически аномальных клеток. Регистрируется распределение сигналов для морфологически аномальных клеток, показывающих либо увеличение некоторых хромосом (т.е. 3 или более сигналов) для более чем 1 из следующих (CEP 3 красный, CEP 7 зеленый или CEP 17 голубой) зондов или гомозиготная потеря 9p21 (т.е. нет сигналов для LSI 9p21 желтого цвета).

Анализ продолжается до тех пор, пока ≥4 клеток с увеличенным числом хромосом не будет обнаружено или ≥12 клеток с гомозиготной потерей 9p21 не будет выявлено, или пока весь образец не будет проанализирован. Определяют Общее количество хромосомно-аномальных клеток, т. е. клеток с увеличенным числом хромосом или гомозиготную потерю 9p21; результаты сообщаются как положительный или как отрицательный. Наше клиническое исследование показало, что образцы от пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря достоверно обнаружили ≥4 клетки с увеличенным количеством хромосом или ≥12 клеток с потерей обеих копий 9p21.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Результаты в точке отсечения или около нее (4 клетки с увеченным количеством хромосом или 12 клеток с гомозиготной потерей 9p21) должны интерпретировать с осторожностью. Образцы слайдов стекол следует пересчитать другому пользователю, чтобы удостовериться в правильности результатов. Если Вы все еще сомневаетесь в правильности анализа, его необходимо повторить на новом стекле. Если результаты теста не согласуются с клиническими данными, консультации между патологом и лечащим врачом оправданы.

ПРИЧИНЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ ТЕСТА

Ниже приведены ситуации, требующие повторного анализа с новым образцом или существующими стеклами и соответствующими контрольными стекла. Обратитесь к руководству по поиску и устранению неисправностей (таблица 1) для возможных причин и необходимых действий для устранения конкретной проблемы.

1. Если одна или обе таргетные мишени контрольного слайда не соответствуют слайдам с критериями приемлемости, результаты слайдов образца не являются надежными, анализ должен быть повторен.
2. Если имеется менее 25 оцениваемых ядер, тест неинформативен и анализ должен быть повторен.
3. Если при оценке качества слайда какие-либо технические аспекты (интенсивность сигнала, фон или перекрестная гибридизация) являются неудовлетворительными, анализ должен быть повторен.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. UroVysion Kit был оптимизирован для идентификации и количественного определения хромосом 3, 7 и 17 и локуса 9p21 в образцах мочи человека.
2. Производительность UroVysion Kit была подтверждена с использованием процедуры, указанной внутри упаковки. Модификации для этих процедур могут изменить производительность анализа.
3. Клиническая интерпретация результатов любого теста должна быть оценена в контексте истории болезни пациента и других результатов диагностических лабораторных исследований.
4. Результаты анализа UroVysion могут быть не информативными, если качество образца и/или подготовка предметного стекла выполнена неудовлетворительно, например, наличие избыточных гранулоцитов или массивной бактериурии.
5. Пользователи, выполняющие подсчет сигналов UroVysion, должны визуально различать красный и зеленый сигналы.
6. Положительный результаты UroVysion теста в отсутствие других симптомов или симптомов рецидива рака мочевого пузыря могут быть свидетельством других типов рака мочевыводящих путей, например, мочеточника, мочеиспускательного канала, почки и/или простаты у мужчин, и поэтому оправдано дальнейшее наблюдение за пациентом.

В исследовании, проведенном на пациентах с гематурией (см. Симптоматические пациенты: Производительность в сравнении со стандартным уходом для уточнения деталей в этом клиническом исследовании) 3 пациента, у которых первоначальная цистоскопия мочевого пузыря была отрицательной, были впоследствии диагностированы с раком почки в течение 6 месяцев от начала проведения этих исследований. Все 3 из этих случаев были положительными по тесту UroVysion.

7. Если результаты UroVysion отрицательные, но стандартные клинические или диагностические анализы (например, цитология, цистоскопия) положительные, стандартные процедуры имеют приоритет над тестом UroVysion. Хотя UroVysion Kit был разработан для обнаружения генетических изменений, связанных со случаями рака мочевого пузыря, будут некоторые виды рака мочевого пузыря, чьи генетические изменения не могут быть обнаружены с помощью теста UroVysion.
8. На стадии одиночных опухолей, размером менее 5 мм не могли быть обнаружены UroVysion FISH. Результаты UroVysion FISH зависят от количество опухолевых клеток, которые помещаются на слайде.

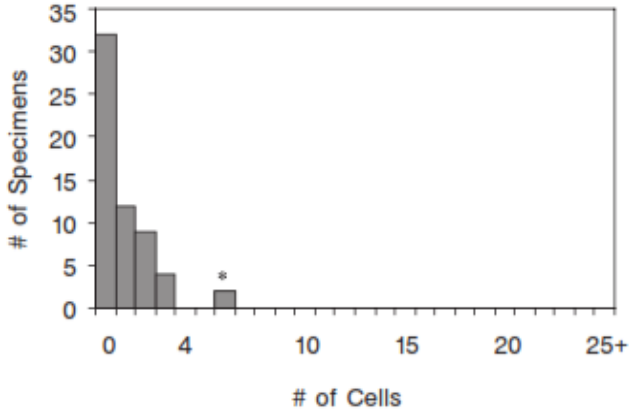
ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Анализ FISH с помощью набора UroVysion был выполнен на образцах мочи от 59 здоровых доноров (50 некурящих и 9 курильщиков), а также часть исследования на специфичность анализа (см. также раздел «Специфичность» ниже). Все 59 образцов здоровых доноров были отрицательными по UroVysion тесту. На рисунке 5. показано распределение хромосомно-аномальных клеток в этой популяции. Обратите внимание, что было 2 образца с ≥4 аномальными клетками (обозначено* на

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

рисунке 5), однако в обоих случаях все 6 образцов аномальных клеток показали гомозиготную потерю только 9p21. Точка отсечения для потери гомозиготности 9p21 это ≥12 клеток, таким образом, эти 2 образца считаются отрицательными.

Рисунок 5. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди здоровых доноров



Значения среди пациентов с раком мочевого пузыря

В проспективном исследовании пациенты с раком мочевого пузыря в анамнезе, 62 пациента с рецидивом заболевания в течение 17 месяцев, было выявлено с помощью цистоскопии/гистологии (см. Клинические исследования; Рецидив рака мочевого пузыря: эффективность в сравнении со стандартом медицинской помощи для деталей относительно этого клинического исследования). Распределение хромосомно-аномальных клеток среди этих 62 пациентов показаны на **Рисунке 6**. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди 114 пациентов без рецидива на основе стандартных клинических исследований (цистоскопия / гистология) показаны на **Рисунке 7**.

Рисунок 6. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря по данным цистоскопии/гистологии

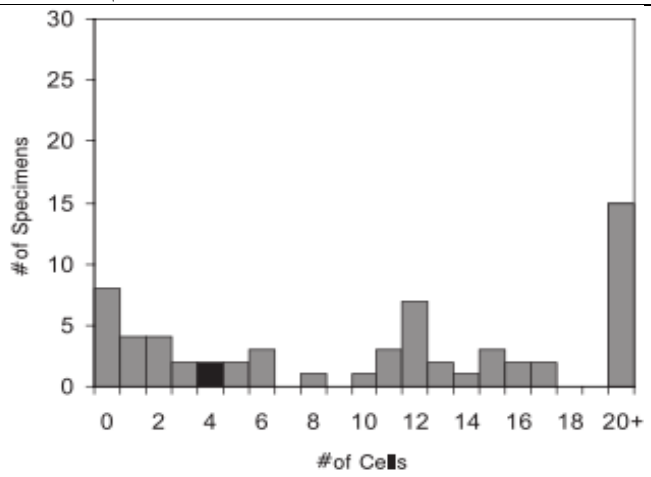
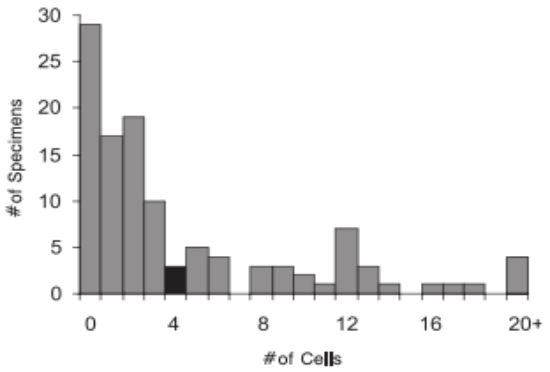


Рисунок 7. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди пациентов без рецидива рака мочевого пузыря, выявленного цистоскопией/гистологией

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



Значения среди пациентов с гематурией, не имеющих в анамнезе рака мочевого пузыря

В проспективном исследовании пациентов с симптомами рака мочевого пузыря у 50 пациентов был диагностирован рак мочевого пузыря цистоскопией/гистологически, и у 1 пациента был диагностирован рак мочеточника (см. Клинические исследования; Симптоматические пациенты: эффективность в сравнении со стандартом медицинской помощи для деталей относительно этого клинического исследования).

Распределение хромосомно-аномальных клеток среди 51 пациента показано на **Рисунке 8**. Распределение хромосомно аномальных клеток среди 419 пациентов, у которых в анамнезе не был диагностирован рак мочевого пузыря, на основании стандартных клинических мероприятий (цистоскопия/гистология) показаны на **Рисунке 9.**

Рисунок 8. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди симптоматических пациентов, положительных по раку мочевого пузыря, выявленным методом цистоскопии/гистологии

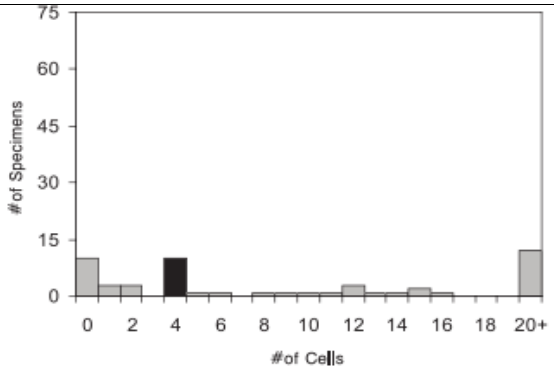
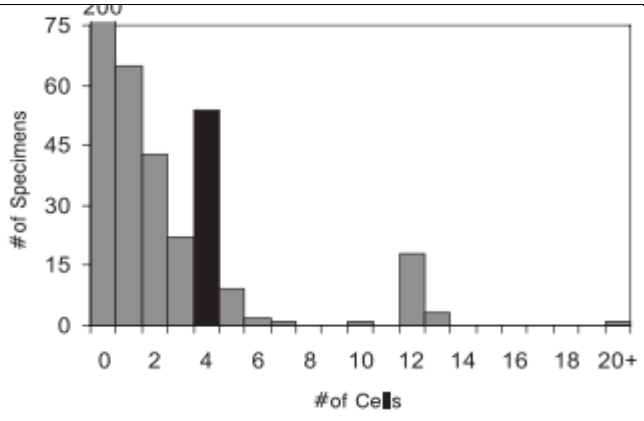


Рисунок 9. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди симптоматических пациентов, положительных по раку мочевого пузыря, выявленным методом цистоскопии/гистологии



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Неклинические

Эффективность гибридизации/Информативные результаты против неинформативных результатов

Слайды контроля качества ProbeChek, разработанные совместно с клиническими испытаниями, 1,2% (4/328) (95% Cl: 0,3%, 3,1%) на целевых регионах не сработали из-за отсутствия гибридизации. Эти слайды приготовлены из культивируемых клеточных линий рака мочевого пузыря человека (положительный контроль) и нормальных лимфобластов (отрицательный контроль), и наиболее подходят для эффективности гибридизации. Таким образом, в этих условиях эффективность гибридизации составила 98,8% (324/328) (95% Cl:96,9%, 99,7%), с <2% клеток, не имеющих сигнала от каких-либо других проб. В подгруппе из 6 контрольных слайдов, проанализированных с использованием автоматизированной станции предварительной обработки (VP 2000 Процессор) и автоматизированные процедуры анализа UroVysion (HYBrite), эффективность гибридизации составила 100% (6/6) (95% Cl: 54,1%, 100%).

В исследовании воспроизводимости, проведенном с использованием ручной предварительной обработки и ручной процедуры анализа UroVysion на подготовленных образцах из клеточных линий рака мочевого пузыря человека, 76 из 80 образцов с первой попытки дали информативные результаты. Из 4 неинформативных 3 образца были неинформативными из-за отсутствия гибридизации. Следовательно, эффективность гибридизации составила 96,2% (76/79) (95% Cl: 89,3%, 99,2%), исходя из следующего определения:

% Эффективности гибридизации=
100-[ошибки гибридизации/(информативные результаты +ошибки гибридизации)]×100

В исследовании на специфичность, проведенном с использованием ручной предварительной обработки и ручной процедуры анализа UroVysion на образцах мочи от пациентов без диагноза рак мочевого пузыря в анамнезе, 230 из 309 образцов дали информативные результаты с первой попытки и 18 неинформативных результаты были обусловлены отсутствием гибридизации, что привело к эффективности гибридизации 93% (230/248) (95% Cl: 88,8%, 95,6%), исходя из определения выше. Остальные неинформативные анализы были результатом низкого качества образца (например, недостаточное количество клеток) или технической ошибка (например, масло под покровным стеклом). Повторные анализы были проведены на 67 образцах; 12 из 79 образцов с неинформативными первоначальными результатами имели недостаточный объем, поэтому пришлось еще раз повторить анализ. Из 67 повторных анализов 45 дали информативные результаты, оставшиеся 34 экземпляра были классифицированы как «неинформативные» (включая 12 случаев с недостаточным объемом для повторного анализа). Таким образом, 89% (275/309) (95% Cl: 85,0%, 92,3%) случаев дали информативный результат с первой или второй попытки.

Аналогично, в клиническом исследовании, проводимом с использованием ручной предварительной обработки и ручной процедуры анализа UroVysion на образцах мочи у пациентов с раком мочевого пузыря, в анамнезе у 175 из 251 образцов информативные результаты были получены с первой попытки и 26 из 76 неинформативных результатов были получены из-за отсутствия гибридизации. Эффективность гибридизации среди этих образцов составила 87,1% (175/201) (95%CI: 81,6%, 91,4%), на основании приведенного выше определения. Остальные неинформативные анализы были результатом низкого качества образцов (например, недостаточное количество клеток) или техническая ошибка (например, разбитый слайд).

Повторные анализы проводились вручную на 70 образцах; 6 из 76 образцов имели недостаточный объем, чтобы повторить анализ. Из 70 повторных анализов 59 дали информативные результаты, оставив 17 образцов, классифицированных как «неинформативные» (включая 6 случаев с недостаточным объемом для повторного анализа). В итоге 93,2% (234/251) (95% Cl: 89,4%, 96,0%) случаев дали информативный результат с первая или вторая попытка.

В клиническом исследовании, проведенном с использованием автоматизированного анализа UroVysion на образцах мочи у симптоматических пациентов с раком мочевого пузыря, 521 из 570 образцов (497 допущенных пациентов плюс 73 уже наблюдаемых) дали информативный результат с первой попытки и 5 из 49 дали неинформативный результат из-за отсутствия гибридизации. Эффективность гибридизации среди этих образцов составила 99,0% (521/526) (95% Cl: 97,8%, 99,7%), исходя из определения, описанного выше. Оставшиеся неинформативные исследования

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

были результатом недостаточного количества образца (например, недостаточное количество клеток) или техническая ошибка (например, разбитый слайд или QC не сработали слайды [Контроля Качества].
В подгруппе из 44 образцов для который использовалась процедура автоматизированной предварительной обработки, эффективность гибридизации составила 96,7% (29/30) (95% Cl: 82,8%, 99,9%).
Повторные анализы были проведены на 43 образцах; 6 из 49 экземпляров имели недостаточный объем, чтобы повторить анализ. Из 43 повторных анализов, 26 анализов дали информативные результаты, 23 экземпляра были классифицированы как «неинформативный» (включая 6 случаев с недостаточным объемом для повторения анализа). Таким образом, 96,0% (547/570) (95% Cl: 94,0%, 97 случаев дали информативный результат с первой или второй попытки.
Подводя итог, при всех этих условиях, которые моделируются в обычной клинической практике, эффективность гибридизации оказалась≥87%. Исследования показали также, что эффективность гибридизации между образцами, которые обрабатываются с использованием ручных и автоматизированных процедур были эквивалентны.

Аналитическая специфичность
Исследования специфичности локуса проводились с метафазными пластинками в соответствии со стандартными протоколами Abbott Molecular QC. В общей сложности были исследованы 42 метафазные пластинки последовательно путем связывания с DAPI для идентификации хромосом 3, 7 и 17 и локуса 9p21, затем с UroVysion. Не наблюдалось перекрестной гибридизации с другими локусами хромосом в любой из 42 исследованных клеток; гибридизация была ограничена в направлении к таргетным регионам 4 проб.

Интерференция
Три порции мочи (1 мужская, 1 женская, 1 смешанный мужская/женская) от здоровых доноров были оценены на вещества, перечисленные в **Таблица 2** и проанализирована с помощью UroVysion Kit для проверки на возможный токсикологический анализ. Повторные образцы для каждого пула мочи были оценены на каждое вещество (т.е. 6 образцов на каждое испытуемое вещество); 25 последовательных
клеток были подсчитаны для каждого образца. Не были обнаружены никакие вмешательства от любого из протестированных веществ; Результаты от всех образцов были отрицательными (т.е. <4 аномальных клетки, как определено в инструкции). Самые высокие концентрации, протестированные для каждого вещества, приведены в **Таблице 2.** Обратите внимание, что проведение этого исследования на образцах мочи у пациентов с раком мочевого пузыря не было возможно из-за объема, необходимого для получения достаточного количества клеток для репликации образца при определенных условиях. Отсюда и воздействие на образцы, содержащие морфологически аномальные клетки не было оценено.

Таблица 2.

Вещество	**Наибольшая тестируемая концентрация**
Возможные составляющие мочи	
Альбумин	1,0 г/дЛ
Аскорбиновая кислота	5 г/дЛ
Билирубин (несвязанный)	2 мг/мл
Гемоглобин	100 мг/мл
Иммуноглобулин G	10 мг/ дЛ
Красные клетки крови	1×10^6 клеток/мл
Белые клетки крови	1×10^6 клеток/мл
Хлорид натрия	730 мг/дЛ
Мочевая кислота	250 мг/дЛ
Кофеин	117 мг/дЛ
Этанол	1%
Никотин	28 мг/дЛ
Возможная контаминация микроорганизмами	
Candida albicans	$2,5\times10^{10}$ КОЕ/мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Escherichia coli	$2,5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл
Pseudomonas aerugenosa	$2,5 \times 10^{12}$ КОЕ/мл
Терапевтические агенты	
Ацетоминофен	5,2 г/дЛ
Ацетилсалициловая кислота	5,2 г/дЛ
Ампициллин	600 мг/дЛ
БСЖ	20 мг/дЛ
Доксорубицин-HCl	10 мг/дЛ
Митомицин-HCl	10 мг/дЛ
Нитрофурантоин	50 мг/дЛ
Феназопиридин-HCl	200 мг/дЛ
Тиотепа	10 мг/дЛ
Триметоприн	50 мг/дЛ
Консерванты	
Карбовакс	2% Карбовакс/50% раствор этанола (33 мл мочи с 17 мл консерванта)
UroCor, Inc. фиксатор	50/50 с мочой
CytoRichRed (Autocyte)	50/50 с мочой
Saccamonoˈs раствор	50/50 с мочой
PreservCyt раствор (Cytyc)	50/50 с мочой
100% Этанол	50/50 с мочой

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость образцов пациентов

Проведение исследований воспроизводимости образцов мочи у пациентов с раком мочевого пузыря были невозможны; т.к. клеточный осадок от одного пациента не содержит достаточное количество клеток, необходимое для повторения исследования между разными наблюдателями. Поэтому не оценивалась воспроизводимость результатов по морфологически аномальным клеткам. Отсутствуют сравнения мер воспроизводимости, объемы результатов вариации, представленных образцом, не известны ошибки манипуляции, окрашивания и подсчета. Статистика для небольшого количества событий подразумевает существенный коэффициент вариации для образцов с аномальным количеством клеток, близким к 4-клеточным и 12-клеточным точкам отсечения, описанным в **Интерпретации Результатов.**

Воспроизводимость образцов клеточной культуры рака мочевого пузыря

Чтобы оценки воспроизводимость теста UroVysion, анализировалось распределение сигналов для CEP 3, CEP 7, CEP 17 и LSI 9p21 и оценивалось на предмет воспроизводимости между участками (4) на слайдах, подготовленных из 4 различных клеточных линии рака мочевого пузыря. Четыре образца подготовлены из линий клеток карциномы мочевого пузыря человека с нормальным (1 образец) и абнормальным (3 образца) распределением сигналов и оценены для CEP 3, CEP 7, CEP 17 и LSI 9p21 в соответствии с инструкциями для анализа контроля качества слайдов внутри упаковки (см. Интерпретация результатов: анализ слайдов контроля качества). Каждый участок одного и того же образца был проанализирован 4 раза в каждый из 4 дней исследования (каждый день разные образцы), используя одну пробную партию для всех образцов. В каждый день анализа добавляли дополнительный образец «подстановочный знак» для устранения смещения и не включали его в анализ данных. Каждый образец оценивал 1 наблюдатель на каждом участке. Информативные результаты были получены в 95,0% (76/80) образцов с первой попытки. Гибридизация всех сменных слайдов прошла успешно.

Среднее значение, стандартное отклонение и процент CV от среднего числа сигналов для 4 зондов приведены в **Таблице 3**. Как показано в этой таблице, среднее количество сигналов для каждого зонда варьируется в узком диапазоне. Отсутствие сигналов LSI 9p21 в образце 2 вызывает большой % CV для этой пробы, но образец легко классифицируется как имеющий потерю локус 9p21; в 95% наблюдений на этом образце (19/20) среднее количество сигналов LSI 9p21 было <0,2. В данном исследовании на образцах клеточных линий карциномы рака мочевого пузыря не было выявлено ложно отрицательных результатов; все обследованные образцы (48/48) 2, 3 и 4 (16 каждый) были бы классифицированы как положительные по определению≥4 клеток с увеличенным количеством

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

хромосом (3 или более сигналов для 2 или более CEP 3, CEP 7 или CEP 17) или ≥12 клеток с потерей гомозиготности 9p21 (0 сигналов LSI 9p21). Из 16 обследованных нормальных образцов, 1 был классифицирован как положительный, используя вышеуказанное определение; этот случай показал 6 клеток с увеличением количества хромосом.

Таблица 3. Воспроизводимость между сайтами

		Номер сигнала			
Образец	**Статистика**	**CEP 3**	**CEP 7**	**CEP 17**	**LSI 9p21**
1.	Значение	2.21	2.12	2.14	2.19
	S.D.	0.15	0.12	0.12	0.21
	C.V. (%)	6.79%	5.52%	5.66%	9.66%
	Диапазон	2.08-2.68	1.92-2.40	1.96-2.52	2.00-2.92
	n	16	16	16	16
2.	Значение	3.95	4.31	3.42	0.03
	S.D.	0.10	0.25	0.16	0.07
	C.V. (%)	2.49%	5.76%	4.76%	220.44%
	Диапазон	3.84-4.16	3.76-4.84	3.16-3.72	0.00-0.24
	n	16	16	16	16
3.	Значение	4.28	3.55	3.42	3.86
	S.D.	0.32	0.34	0.25	0.47
	C.V. (%)	7.58%	9.47%	7.21%	12.14%
	Диапазон	3.88-5.04	3.12-4.24	3.04-3.96	3.16-4.72
	n	16	16	16	16
4.	Значение	3.18	3.88	3.84	3.85
	S.D.	0.15	0.10	0.10	0.15
	C.V. (%)	4.63%	2.45%	2.70%	3.90%
	Диапазон	2.96-3.52	3.64-4.04	3.64-4.12	3.56-4.24
	n	16	16	16	16

Клинические исследования

Рецидив рака мочевого пузыря: эффективность в сравнении со стандартом лечения

Обзор исследования

Многоцентровое проспективное исследование было проведено в 21 месте в течении 17 месяцев для дальнейшего определения характеристик производительности набора UroVysion относительно цистоскопии с последующей гистологией, стандартной медицинской помощью для мониторинга рецидива заболевания у пациентов, у которых ранее был диагностирован рак мочевого пузыря. Сравнительный анализ, используемый для всех расчетов это цистоскопия с гистологическим подтверждением для положительных или подозрительных цистоскопий. Если у пациента была положительная цистоскопия, но гистология отсутствовала (например, очаг поражения), тогда образец считался положительным по раку мочевого пузыря. Если после теста была подозрительная цистоскопия, но гистология отсутствовала, в последующем случай исключался из анализа. В общем, 309 пациентам было проведено исследование в 21 сайте, что привело к 251 служебному визиту в лабораторию. В 58 нежелательных визитов включено 17, которые не соответствовали критериям приемлемости, 16 с недостаточным объемом мочи, 10 с подозрительной цистоскопией, но без гистологии, а в 15 случаях моча не была отправлена в испытательные лаборатории.

Все образцы были законсервированы в Carbowax. Обработка мочи и анализ проводился в 1 лаборатории централизованного тестирования. Руководство для процедуры предварительной обработки и ручного анализа UroVysion были использованы для всех образцов. Анализ на UroVysion и анализ на 251 участвующих в исследовании при посещении лаборатории, привели к 234 информативным результатам, представленными 176 уникальными пациентами. Для пациентов, у которых был выявлен рецидив во время исследований (как было выявлено цистоскопией/гистологией), был использован первый положительное визит (т.е. визит, при котором был установлен диагноз рецидива). Для безрецидивных пациентов, последний отрицательный визит

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

был использован для пациентов с более чем 1 посещением. Демография для 176 уникальных пациентов представлена в **Таблице 4.**

Таблица 4. Демографическое исследование пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря	
Пол	
Мужской	132
Женский	44
Раса	
Кавказцы	153
Афроамериканцы	3
Латиноамериканцы	3
Другие	13
Неизвестные	4
Возраст	
Диапазон	36-98
Средний возраст	71 год

Производительность против Стандарта обслуживания

Из отвечающих критериям пациентов с информативными результатами UroVysion 62 образца были положительными при проведении цистоскопии/гистологии. Распределение количества опухолей по стадии и оценкам приведены в **Таблице 5.**

Таблица 5. Номер опухоли, стадия Grade у пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря						
Степень распространенности опухолевого процесса						
Стадия опухолевого процесса	**ND**	**1**	**2**	**3**	**Неизвестно**	**Общее количество**
ND	11	0	0	0	0	11
T_a	0	20	6	6	0	32
T_1	0	0	2	3	1	6
T_2	0	0	0	2	1	3
T_{is}	0	0	0	7	0	7
Неизвестно	0	2	1	0	0	3
Общее количество	11	22	9	18	2	62

ND= не установлено или не было биопсии

Таблица 6 показывает производительность теста UroVysion, относительно цистоскопии/гистологии, в зависимости от стадии и степени опухолевого процесса для всех случаев с доступной информацией по биопсии. Набор UroVysion показал наибольшую клиническую чувствительность (100%) среди самых серьезных опухолей (T2 и Tis), когда его сравнили с цистоскопией/гистологией.

Таблица 6. Сравнение теста UroVysion против цистоскопии/гистологии для выявления рецидива рака мочевого пузыря на стадии опухолевого процесса	
Клиническая чувствительность (%)	
Стадия	
Все	**36/48 (75%)**
Ta, Grade 1	**11/20 (55%)**
Ta, Grade	
2,3	10/12 (83.3%)
T_1	5/6 (83.3%)
T_2	3/3 (100%)
T_{is}	7/7 (100%)
Степень распространённости опухолевого процесса	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Все	36/49 (73.5%)
1	12/22 (54.5%)
2	7/9 (77.8%)
3	17/18 (94.4%)

[a] Биопсия не была выполнена в 11 случаях. Кроме того, ни одного этапа не было назначено в 3 случаях и не оценивался Grade в 2 случаях.

Таблица 7 Таблица 7 показывает сравнение производительности к UroVysion относительно цистоскопии с последующей гистологией. В целом, анализ FISH с набором UroVysion продемонстрировал клиническую чувствительность 71,0% и клиническая специфичность 65,8% по сравнению с результатами цистоскопии, с последующей гистологией в случаях положительной или подозрительной цистоскопии

Примечание: Положительная цистоскопия без биопсии считалась положительный в этом анализе.

Таблица 7. Сравнение теста UroVysion с цистоскопией/гистологией для выявления рецидива рака мочевого пузыря

		Цитология/Гистология		
UroVysion		+	-	Общее
	+	44	39	83
	-	18	75	93
	Общее кол-во	62	114	176

Клиническая чувствительность = 71.0% (44/62) (95% Cl =58.1%-81.8%)
Клиническая специфичность = 65.8% (75/114) (95% Cl = 56.3% - 74.4%)
Точность = 67.6% (119/176) (95% Cl=60.2% - 74.5%)
(+) Прогнозное значение = 53,0% (44/83) (95% ДИ = 41,7% - 64,1%)
(-) Прогнозное значение = 80,6% (75/93) (95% ДИ = 71,1% - 88,1%)
Распространенность = 35,2% (62/176) (95% ДИ = 28,2% - 42,8%

Положительные и отрицательные прогностические значения теста UroVysion могут быть определенным для показателей распространенности 10%, 20% и 30%; эти значения представлены в таблице 8. Эта экстраполяция предполагала клиническую чувствительность 71,0% и клиническую специфичность 65,8% **(Таблица 7).**

Таблица 8. Гипотетический Позитивные Предсказательные и Негативные Предсказательные значения теста UroVysion

Распространённость рецидива рака мочевого пузыря	**PPV**	**NPV**
10%	18.7%	95.3%
20%	34.2%	90.1%
30%	47.1%	84.1%

Таблица 9 показывает сравнение производительности теста UroVysion относительно цистоскопии/гистологии у пациентов, которые получали свое последниее лечение внутрипузырной БЦЖ в течение 3 месяцев после проведение теста на UroVysion. Средняя продолжительность лечения БЦЖ составила 1,3 месяца (диапазон 0,4 до 3,4 месяца). Среднее время между последним лечением БЦЖ и тестированием на UroVysion среди этих пациентов составило 1,3 месяца; диапазон был 0 (лечение продолжается во время тестирования UroVysion) до 3 месяцев. Три из 12 истинно положительных случаев были Tis, 3 были стадией Ta степени 1, 3- 3-я ступень Ta, 2-3-я ступень T1, 1-я ступень T2 класс 3 (мышечно-инвазивный); 1 ложноотрицательный случай был этапом Ta класс 1.

Таблица 9 Сравнение теста UroVysion против цистоскопии/гистологии для выявления рецидива рака мочевого пузыря у пациентов, получающих терапию БСЖ в течении трех месяцев

		Цитология/Гистология		
U r o		+	-	Общее

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	+	12	10	22
	-	1	16	17
	Общее кол-во	13	26	39

Клиническая чувствительность = 92,3% (95% ДИ = 64,0%-99,8%)
Клиническая специфичность = 61,5% (95% ДИ = 40,6%-79,8%)
Точность=71,8% (95% ДИ=55,1%-85,0%)
(+) Прогнозное значение = 54,5% (95% ДИ=32,2%-75,6%)
(-) Прогнозное значение=94,1% (95% ДИ=71,3%- 99,9%)
Распространенность=33,3% (95% ДИ=19,1% - 50,2%

Длительные исследования

В качестве продолжения проспективного исследования описанного выше, информация о посещении центра (без тестирования UroVysion или BTAstat) была впоследствии собрана для пациентов без рецидива заболевания (т.е. цистоскопия/гистология отрицательная) в течение периода приблизительно 1 года с их последнего визита во время основного этапа медицинских исследований. Из 114 имеющих право Пациенты, информация о посещении центра была собрана у 105. Всего сообщалось о 335 посещениях пациентов, в результате чего было получено 299 посещений в центре, представляющих 104 уникальных пациентов.

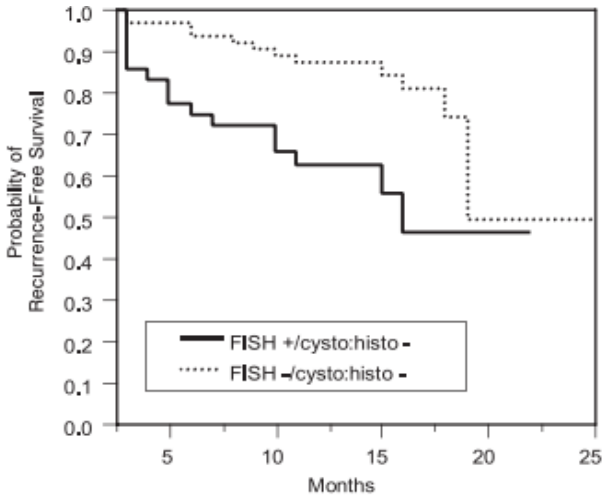
Из 36 непригодных для визита посещений вошли 21, которые не соответствовали критериям приемлемости и 15 с подозрительными цитоскопиями, но без гистологии. Для пациентов с рецидивом заболевания (как определено цитоскопией/гистологией) был использован первый положительный визит. Для пациентов без рецидива, был использован последний отрицательный визит для тех, которые посещали центр более одного раза.
Результаты показали рецидив у большого процента пациентов с положительным тестом UroVysion, отрицательные по цистоскопии/гистологии, с отрицательным тестом Urovysion, отрицательная группа по цистоскопии/гистологии. Результаты представлены в **Таблице 10.**

Таблица 10. Результаты многолетних исследований		
	UroVysion- /цито:гисто-	UroVysion+ /цито:гисто-
% Рецидивов	19.12% (13/68)	41.67% (15/36)
Время наблюдения (месяцы)		
Без рецидива	14.3±3.9	13.5±3.4
Рецидив заболевания	11.0±5.8	6.9±4.4
Детали рецидива заболевания[a] **Стадия**		
T_a G1	5	3
T_a G2,3	0	1
T_1	2	0
T_{is}	0	1
Степень распространённости опухолевого процесса		
1	5	5
2	1	1
3	1	1

[a]Биопсия не была выполнена в 8 случаях (4 UroVysion+/цито: гисто-,4 UroVysion-/цито:гисто-). Слайды не были предоставлены в местах сбора для оценки главным патологом в 6 случаях (4 UroVysion + /цито: гисто-, 2 уроВизион-/цито: гисто-). Никакой этап не был назначен в 2 случаях UroVysion + /cysto:гисто-.

Таблица 10. Безрецидивная выживаемость для пациентов с UroVysion-/cysto: histo - против UroVysion +/цито: гисто – Группы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



Специфичность

Резюме исследования

В дополнение к тесту UroVysion установлены клинические особенности 65,8% в исследовании рецидива рака мочевого пузыря и 77,7% установлены в результате исследование гематурии, проспективное исследование было проведено для того, чтобы установить специфичность теста UroVysion у здоровых людей и урологических пациентов без предшествующего анамнеза или клинических признаков рака мочевого пузыря. В общей сложности 315 визитов пациентов было проведено в связи с этими пробными исследованиями, в результате которых было 309 визитов в лабораторию, 6 непригодных визитов включали 1, что не соответствовало критериям приемлемости исследования, 4 с недостаточным объемом мочи, а в 1 случае моча не была отправлена в испытательную лабораторию. Все образцы были сохранены в Carbowax. Ручная предварительная обработка и ручные процедуры анализа UroVysion были использованы для всех образцов.

Поскольку состояние здоровья нескольких пациентов попало в несколько категорий, 275 образцов от пациентов, дающих информативные результаты, представляли 357 частных значения. Популяция пациентов суммирована по категориям и представлена в **Таблице 11.**

Таблица 11. Популяция пациентов

Условия	**№ Номер пациента**
Здоровые доноры	59
Некурящие	50
Курящие	9
Доброкачественные заболевания	48
Non-GU Рак	3
GU Заболевания	184
Доброкачественная гиперплазия предстательной железы	58
Микрогематурия	
Интерстициальный цистит	11
Воспаление/Инфекция: Другие	17
STD	2
Другие	81
GU Рак (не мочевого пузыря)	61
Рак предстательной железы	58
Рак почки	3
GU Травма	2
Общее число**:**	**357**

Специфичность

Общая специфичность теста UroVysion у здоровых людей и урологических пациентов без предшествующего анамнеза или клинических проявлений рака мочевого пузыря составила 93,0% (332/357). Краткое изложение общей специфики и специфичность по категориям показана в **Таблице 12.** Для ликвидации потенциального отклонения, включающего несколько данных для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

любого конкретного пациента, специфичность была также рассчитана как «уникальные случаи», где каждый пациент был подсчитан только один раз, независимо от количества присутствующих медицинских условий. Специфичность среди уникальных случаев составила 94,5% (260/275, **Таблица 12**).

Таблица 12. Резюме: Специфичность теста Urovysion	
Общая Специфичность (332/357)	93.0%
Особые пациенты (260/275)	94.5%
Здоровые Больные	
Здоровые (59/59)	100%
Больные (234/247)	94.7%
Курящие Некурящие	
Курящие	95.2%
Некурящие (234/247)	94.7%
Индивидуальные категории[b]	
Здоровые доноры (59/59)	100%
Здоровые некурящие (50/50)	100%
Здоровые курящие (9/9)	100%
Доброкачественные заболевания 91.7% (44/48)	
Non-GU Рак[c] 66.7% (2/3)	
GU Заболевания (169/184)	91.9%
Доброкачественная гиперплазия предстательной железы 91.4% (53/58)	
Микрогематурия (13/15)	86.7%
Интерстициальный цистит 90.7% (10/11)	
Воспаление/Инфекция: Другие 100% (17/17)	
STD 100% (2/2)	
Другие 91.4% (74/81)	
GU Рак (не мочевого пузыря) 91.8% (56/61)	
Проста 91.4% (53/58)	
Рак почки 100% (3/3)	
GU Травма 100% (2/2)	

[a] Статус курения был не известен у одного пациента

[b] У некоторых нездоровых пациентов было несколько категорий заболеваний, в результате общее количество> 275 для отдельных категории болезней.

[c] Non-GU рак включает рак молочной железы (1), рак кишечника (1), и лейкимия (1).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Основываясь на популяции пациентов в этом исследовании, и проведение теста UroVysion для них, когда используем ручную предварительную обработку и ручной анализ для теста UroVysion, продемонстрирована общую специфичность 93,0% (332/357), со 100% специфичностью (59/59) среди здоровых субъектов. Специфичность среди уникальных случаев была 94,5% (260/275). Ложноположительные результаты выявлены у 15 пациентов, представлены следующие категории (обратите внимание, что у некоторых пациентов были проблемы со здоровьем, попадающие в несколько категорий заболеваний); не мочеполовые (ГУ) доброкачественные заболевания (4), рак без ГУ (1), заболевания ГУ (15) и рак ГУ (5). Эти результаты показывают, что тест очень специфичен для этой группы пациентов и что зонды UroVysion связываются только с предполагаемыми хромосомами.

Симптоматические пациенты: Эффективность в сравнении со стандартами ухода.

Резюме исследования

Многоцентровое проспективное исследование было проведено, чтобы определить характеристики производительности теста UroVysion относительно цистоскопии с последующей гистологией, стандартом лечения, диагностикой рака мочевого пузыря у пациентов с гематурией. Для всех расчетов использовалась сравнительная справка: цистоскопия с гистологическим подтверждением положительных или подозрительных цистоскопий. Всего 629 посещений пациентов были согласованы в 23 местах исследования, в результате чего было отобрано 497 подходящих пациентов. Среди 132 неподходящих пациентов: 74, которые не соответствовали критериям приемлемости; 12 с недостаточным объемом мочи; 14, у которых моча была неправильно отправлена в испытательные лаборатории; 12 кто изначально согласился, но затем отказался приезжать для предоставления образцов мочи; 18 чьи образцы были собраны после окончания исследования, или чья моча не была отправлена в испытательную лабораторию; и 2, которые сообщили, что согласие на процедуру не было должным образом задокументировано. Обработка и анализ мочи были проведены в 3 централизованных испытательных лабораториях. Все образцы были сохранены в PreservCyt. Две из 3 лабораторий использовали ручной метод предварительной обработки; 1 лаборатория использовала автоматизированную процедуру предварительной обработки. Все анализы UroVysion были проведены с использованием автоматизированной (HYBrite) процедуры. Демография 497 подходящих пациентов сведены в **Таблицу 13.**

Таблица 13. Демография пациентов Изучение симптоматических пациентов	
Пол	
Мужской	298
Женский	199
Раса	
Кавказцы	440
Афроамериканцы	26
Испанцы	15
Азиаты	4
Другие/Не установлены	12
Возраст	
Диапазон	63.1 года
Средний возраст	40-97 лет

Производительность против Качества обслуживания

Тест UroVysion и анализ на 497 пациентах привели к 479 информативным результатам. Из 479 первоначальных исследований с информативными результатами; 6 пациентов имели неинформативные результаты цитологии и, согласно протоколу, не были включены в анализ, оставив 473 пациента в основном наборе данных. Из 473 подходящих пациентов в основном наборе данных, 50 были с положительным результатом на рак мочевого пузыря по данным цистоскопии/гистологии и 1 с раком мочеточника. Разбивка количества опухолей по стадиям и классам показана в **Таблице 14.**

Таблица 14. Номер опухоли, стадия опухолевого процесса Grade у симптоматических пациентов
Степень распространенности опухолевого процесса

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Стадия опухолевого процесса	1	2	3	Неизвестно	Общее количество
T_a	21	6	4	0	31
T_1	0	3	3	1[c]	7
T_2	0	1	8	1[c]	10
T_{is}	0	0	1[a]	0	1
Неизвестно	0	0	1	1[b]	2
Общее количество	21	10	17	3	51

[a]**ПРИМЕЧАНИЕ: Противоречивый анализ как местного патолога и альтернативного патолога из центральной лаборатории показал отсутствие рака.**

[b]Один случай, чье первоначальное цистоскопическое исследование было отрицательным, но который был впоследствии диагностирован как рак мочеточника в течение 6 месяцев от первоначального визита.

[c]Аденокарциномы

Таблица 15 Показывает производительность теста UroVysion, относительно цистоскопии/гистологии, по стадии и степени распространённости опухолевого процесса для всех положительных случаев.

Таблица 15. Сравнение теста UroVysion против цистоскопии/гистологии для выявления рецидива рака мочевого пузыря по стадии и распространённости опухолевого процесса

	UroVysion	**Цитология**
Стадия		
TaG1	48% (10/21)	24% (5/21)
TaG2	83% (5/6)	50% (3/6)
TaG3	100% (4/4)	50% (2/4)
T_1	86% (6/7)	43% (3/7)
T_2	90% (9/10)	60% (6/10)
T_{is}	0% (0/1)[b]	0% (0/1)[b]
Неизвестно[a]	50% (1/2)	50% (1/2)
Степень распространённости		
1	48% (10/21)	24% (5/21)
2	70% (7/10)	30% (3/10)
3	88% (15/17)	53% (9/17)
Неизвестно[a,c]	100% (3/3)	100% (3/3)

[a] 1 случай с неизвестной стадией (G 3); 1 случай–рак мочеточника с неизвестной стадией и степенью распространённости опухолевого процесса

[b] **Примечание: Противоречивый анализ как местного патолога и альтернативного патолога из центральной лаборатории показал отсутствие рака.**

[c] Включено две аденокарциномы (1 стадия T1, 1 стадия T2) с неизвестной стадией.

Таблица 16 Показывает сравнение производительности теста UroVysion относительно цистоскопии с последующей гистологией. В целом, анализ FISH набором UroVysion продемонстрировал клиническую чувствительность 68,6% и клиническую специфичность 77,7% по сравнению с результатами цистоскопии, с последующей гистологией в случае положительной или подозрительной цистоскопии.

Таблица 16 Сравнение теста UroVysion против цистоскопии/гистологии для выявления рака мочевого пузыря: включены случаи аденокарциномы

		Цитология/Гистология		
UroVysion		+	-	Общее
	+	35	94[b]	129

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	-	16	328	344
	Общее кол-во	51[a]	422	473

[a] включает один случай рака мочеточника

[b] Включает 3 пациентов с диагнозом опухоль мочевого тракта в течении 6 месяцев от их визита
Клиническая чувствительность = 68,6% (35/51) (95% ДИ = 54,1%-80,9%)
Клиническая специфичность = 77,7% (328/422) (95% ДИ = 73,4%-81,6%)
Точность = 76,7% (363/473) (95% ДИ=72,7%-80,5%)
(+) Прогнозное значение = 27,1% (35/129) (95% ДИ=19,7%-35,7%)
(-) Прогнозное значение = 95,3% (328/344) (95% ДИ=92,6%-97,3%)
Распространенность = 10,8% (51/473) (95% ДИ=8,1%-13,9%
Таким образом, отрицательный результат не исключает всех случаев рака мочевого пузыря. Также отрицательный результат UroVysion не означает, что человек никогда не заболеет раком мочевого пузыря.
Кроме того, у 3 пациентов, у которых начальная цистоскопия мочевого пузыря была отрицательной, впоследствии были диагностированы опухоли мочевыводящих путей (pTaG3 переходно-клеточный рак почечной лоханки; G3 инвазивный папиллярный уротелиальный рак мочеточника плюс Tis мочеточника; аденокарцинома левой почки) в течение 6 месяцев после первоначального ознакомительного визита. Все 3 случая были положительными по UroVysion; 1 из 3 был положительным по цитологии.
Положительный UroVysion приводит к отсутствию других признаков или симптомов рецидива рака мочевого пузыря и может быть свидетельством раковых заболеваний мочевыводящих путей, связанные, например, с раком мочеточника, мочеиспускательного канала, почки и/или простаты у мужчин, и дальнейшее наблюдение за пациентом оправдано.
Положительные и отрицательные прогностические значения теста UroVysion могут быть определены для показателей распространенности 1%, 3% и 10,5%; эти значения представлены в **Таблице 17**. Эта экстраполяция предполагала клиническую чувствительность 68,6% и клиническую специфичность 77,7% (**Таблица 16**).

Таблица 17. Гипотетический Позитивные Предсказательные и Негативные Предсказательные значения теста UroVysion

Распространённость рака мочевого пузыря	**PPV**	**NPV**
1.0%	3.1%	99.6%
3.0%	8.9%	98.9%
10.5%	27.0%	95.5%

БИБЛИОГРАФИЯ

1. National Comprehensive Cancer Network, Inc. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Bladder Cancer. Version 2.2011. 2011. NCCN Web site. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder.pdf. Accessed April 4, 2011.
2. Gibas Z, Gibas L. Cytogenetics of bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997; 95:108-115.
3. Raghavan D, Shipley WU, Garnick MB, et al. Biology and management of bladder cancer. *N Engl J Med*. 1990; 322(16):11291138.
4. Fair WR, Fuks ZY, Scher HI. Cancer: Principles & Practice of Oncology, 4th ed. (ed. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA). J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA. 1993:1052-1072.
5. Grossfeld GD, Wolf JS, Litwin MS, et al. Asymptomatic Microscopic Hematuria in Adults: summary of AUA best practice policy recommendations. *Am Fam Phys*. 2001; 63(6):1145-1154.
6. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al. Molecular detection of primary cancer by microsatellite analysis. *Science*. 1996; 271:659-662.
7. Sarosdy MF, deVere White RW, Soloway MS, et al. Results of a multicenter trial using BTA Test to monitor for and diagnose recurrent bladder cancer. *J Urol*. 1995; 154:379-384.
8. Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, et al. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res*. 1991;51: 3807-3813.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Smeets AWGB, Schapers R, Hompan AHN, et al. Concordance between karyotyping and in situ hybridization procedures in the detection of monosomy 9 bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993; 71:97-99.
10. Sauter G, Moch H, Wagner U, et al. Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995; 82:163-169.
11. Matsuyama H, Bergerheim USR, Nilsson I, et al. Nonrandom numerical aberrations of chromosomes 7, 9, and 10 in DNA-diploid bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994; 77:118-124.
12. Hopman AHN, Moesker O, Smeets AWGB, et al. Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res*. 1991 ;51:644-651.
13. Cajulis RS, Haines GK, Frias-Hidvegi D, et al. Cytology, flow cytometry, image analysis and interphase cytogenetics by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of transitional cell carcinoma in bladder washes: a comparative study. *Diagnostic Cytopathology*. 1995; 13(3):214-224.
14. Meloni AM, Peier AM, Haddad FS, et al. A new approach in the diagnosis and follow-up of bladder cancer: FISH analysis of urine, bladder washings, and tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993; 71:105-118.
15. Meloni AM, Peier AM, Kingsley KL, et al. FISH studies of urinary cells of patients with bladder cancer. *Urol Oncol*. 1995;1:234-239.
16. Wheeless LL, Reeder JE, Han R, et al. Bladder irrigation specimens assayed by fluorescence in situ hybridization to interphase nuclei. *Cytometry*. 1994; 17:319-326.
17. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The development of a multitarget multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn*. 2000;2(3):116-123.
18. Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol*. 2000;164: 1768-1775.
19. Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of BTAstat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol*. 2002; 167(5):20012006.
20. Sarosdy, MF, Schellhammer P. Bokinsky G, et al. Clinical Evaluation of a Multi-Target Fluorescent In situ Hybridization Assay for detection of Bladder Cancer. *J Urol*. 2002; 168:1950-1954.
21. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, et al. Multitarget Fluorescence In situ Hybridization Assay Detects Transitional Cell Carcinoma in the Majority of Patients with Bladder Cancer and Atypical or Negative Urine Cytology. *J. Urol*. 2003; 169:2101-2105.
22. U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987; 36(suppl. 2S):2S-18S.
23. Riesz, P., G. Lotz, et al. (2007). "Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique." *Pathol Oncol Res.* 13(3):187-94.
24. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
25. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 (ISBN1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
27. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефонам (1-800-553-7042) (в США) +49-6122-580 (другие регионы) или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

UroVysion и другие ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты 5,663,319, 6,376,188, 7,232,655 и 5, 491,224. Vysis LSI, CEP WCP меченые флуорохромами ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты RE40, 494, 6,596,479, 7,115,709, 5, 756,696 и 6,475,720 и 6, 607, 877 даны исключительно на продукцию Abbott Molecular Inc Калифорнийским Университетом. Неинвазивные методы скрининга рака мочевого пузыря защищены патентом США 6,573,042.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

UroVysion, CEP, LSI, SpectrumRed, SpectrumGreen, SpectrumAqua, SpectrumGold, HYBrite, ProbeChek, VP 2000 и Vysis – торговые марки группы компании Abbott в различных юрисдикциях. ThinPrep PreservCyt – торговые марки Cytyc Corporation. ThermoBrite – торговая марка Iris Sample Processing, Inc. Все остальные торговые марки собственность их соответствующих владельцев.

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

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

CE

°2006, 2011, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Апрель 2020
30-608385/R8

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit

en

REF 08L52-001

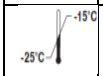
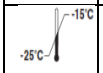
30-608472/R4

Vysis ToTelVysion
Multi-Color FISH Probe Kit

REF 08L52-001
30-608472/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Предназначен для количества тестов <n>
	Биологический риск
	Температурные ограничения
	Опасность
	Хранить при температуре -20°C (±5°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗВАНИЕ

Vysis ToTelVysion многоцветная проба для FISH анализа.

НАЗНАЧЕНИЕ

The Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit используется для хромосом специфических субтеломерных регионов из метефазных регионов культивированной периферической крови, используя метод FISH (флуоресцентная гибридизация in situ).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

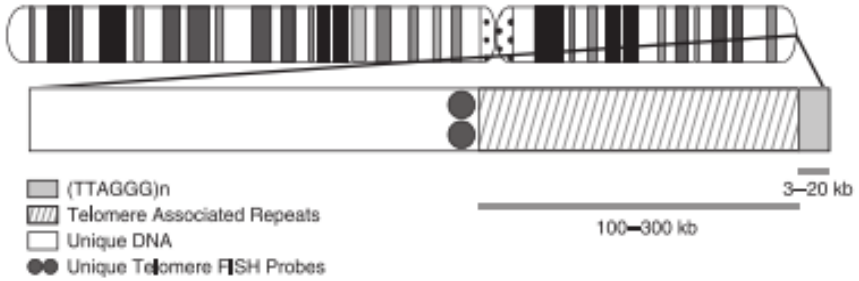
The Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit используется для хромосом специфических субтеломерных регионов из метефазных регионов культивированной периферической крови, используя метод FISH (флуоресцентная гибридизация in situ). Теломеры – это ДНК-белковые комплексы,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

расположенные на концевых участках хромосом эукариот. Каждый теломер содержит от 3 до 20 kB тандемных повторов TTAGGG. Теломер ассоциированные повторы комплементарны TTAGGG повторам. Они содержат регионы общей гомологии между субъединицами центральных хромосом. Уникальные хромосом специфические ДНК размером от 100 до 300 Kb на концах хромосом. В контексте конституционного хромосомного анализа, наиболее дистальные регионы уникальной молекулы ДНК на хромосомном плече обычно называют субтеломеры. Субтеломерные регионы хромосомы человека это наиболее компактное расположение генов. Перестройки и дисбалансы теломерных регионов достаточно тяжело детектируемые рутинным кариотипированием, т.к. субтеломеры часто красятся методом G-бендинга отрицательно. Теломерные регионы теряются из-за делеции и несбалансированной транслокации и ассоциированы с идиопатической умственной отсталостью, задержкой развития и или врожденные дефекты неясной итиологии как показывали исследования с использованием субтеломерных FISH проб[1-4]. ToTelVysion используется как многоцветная проба, многоцветный формат предназначен для скрининга перестройки 41 субтеломерного региона. При гибридизации и визуализации пробы ToTelVysion могут объяснить специфические хромосомные перестройки, такие как делеции, дупликации и транслокации специфических теломерных регионов. Геномный FISH-анализ субтеломерных перестроек проводили на 11688 специально не отбираемых случаях с использованием ToTelVysion. Общий показатель ненормальности составил 3% и идентифицируемые делеции и несбалансированные транслокации как показатель общих субтеломерных перестроек[5].

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Vysis ToTelVysion многоцветная проба состоит из 41 пробы TelVysion с центромерными (CEP) и локуспецифическими контрольными пробами для оказания поддержки в интерпретации (64 пробы в общем). Пробы TelVysion специфичны к: короткому и длинному плечу хромосомы 1 и 12, 16 и 20; длинному субтеломерному плечу акроцентрической хромосомы (13, 14, 15, 21 и 22) и Xp/Yp и Xq/Yq псевдо-аутосомальных регионов субтеломер. Все кроме TelVysion 3q, TelVysion 4q, TelVysion 8p и TelVysion 17q покрывают геномную область предположительно в пределах 300 Kb первичного местоположения существенной уникальной последовательности для своих хромосом. TelVysion 3q, TelVysion 4q, TelVysion 8p и TelVysion 17q покрывают геномную область предположительно в пределах 800 Kb первичного местоположения существенной уникальной последовательности для своих хромосом.
Для получения информации о теломерных позициях пар ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit, перейдите на сайт //www.abbottmolecular.com / продукция / Генетика / FISH / теломер-зонд-Vysis-ToTelVysion.html.
Кроме того, некоторые из многоцветных проб, содержащие уникальные последовательности проб LSI и альфа-саттелитные CEP-пробы для идентификации специфических хромосом в смеси.
Пробы ToTelVysion непосредственно мечены SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорохромами. Пробы LSI и CEP мечены флуорохромом SpectrumAqua.
Пробы в панели ToTelVysion представлены смесью из 15 зондов, позволяющих анализировать 15 таргетных участков на 3 слайдах, подготовленные из одного образца клеток в метафазе (5 гибридизуемых таргетных мишеней на каждый слайд, выбранные пользователем, основанные на распределении клеток).



Схематическое расположение теломерных регионов на хромосоме человека. Диаграмма любезно предоставлена C. Lese and D. Ledbetter, университет Чикаго.

РЕАГЕНТЫ

Смесь зондов ToTelVysion (15 контейнеров, содержащих различные смеси проб, 30 мкл на каждый контейнер). Меченые флуорохромом TelVysion, CEP и LSI зонды и блокирующая ДНК, смешанная с гибридизационным буфером, содержащим сульфат декстрана, формамид и буфер SSC (pH 7.0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ToTelVysion Vial #	Probe Mixture Description
Mix 1	TelVysion 1p SpectrumGreen, TelVysion 1q SpectrumOrange, TelVysion Xp/Yp SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP X SpectrumAqua
Mix 2	TelVysion 2p SpectrumGreen, TelVysion 2q SpectrumOrange, TelVysion Xq/Yq SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP X SpectrumAqua

ToTelVysion Vial #	Probe Mixture Description
Mix 3	TelVysion 3p SpectrumGreen, TelVysion 3q SpectrumOrange, TelVysion 22q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI BCR (22q11) SpectrumAqua
Mix 4	TelVysion 4p SpectrumGreen, TelVysion 4q SpectrumOrange, TelVysion 21q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI AML (21q22) SpectrumAqua
Mix 5	TelVysion 5p SpectrumGreen, TelVysion 5q SpectrumOrange
Mix 6	TelVysion 6p SpectrumGreen, TelVysion 6q SpectrumOrange, TelVysion 13q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI 13 (13q14) SpectrumAqua
Mix 7	TelVysion 7p SpectrumGreen, TelVysion 7q SpectrumOrange, TelVysion 14q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI TCR (14q11.2) SpectrumAqua
Mix 8	TelVysion 8p SpectrumGreen, TelVysion 8q SpectrumOrange, TelVysion 17p SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua
Mix 9	TelVysion 9p SpectrumGreen, TelVysion 9q SpectrumOrange, TelVysion 17q SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua
Mix 10	TelVysion 10p SpectrumGreen, TelVysion 10q SpectrumOrange, TelVysion 15q SpectrumOrange and SpectrumGreen, LSI APL/PML (15q22) SpectrumAqua
Mix 11	TelVysion 11p SpectrumGreen, TelVysion 11q SpectrumOrange, TelVysion 18p SpectrumOrange and SpectrumGreen, CEP 18 SpectrumAqua
Mix 12	TelVysion 12p SpectrumGreen, TelVysion 12q SpectrumOrange, TelVysion 18q SpectrumOrange and
Mix 13	TelVysion 16p SpectrumGreen, TelVysion 16q SpectrumOrange
Mix 14	TelVysion 19p SpectrumGreen, TelVysion 19q SpectrumOrange, LSI 19p13 SpectrumAqua
Mix 15	TelVysion 20p SpectrumGreen, TelVysion 20q SpectrumOrange

ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ

FISH - технология позволяет визуализировать специфические последовательности сиквенсов внутри клеточной популяции. В частности метод FISH включает точный отжиг одноцепочечной, меченой флуорохромом ДНК, комплементарной последовательностимишени.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация пробы с клеточной ДНК визуализируется путем прямой детекции, используя флуоресцентные микроскопы. Интерпретация результатов FISH должна быть произведена с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также принимая во внимание рассмотрение других клинических и диагностических тестов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Vysis ToTelVysion Multi Color FISH Probe Kit должна храниться при -20°C (±5°C) в защищенном от света месте.

Распад: Флуорофоры легко распадаются при воздействии света. Для ограничения распада флуорофоров, все растворы и слайды, содержащие флуорофоры, хранить в защищенном от света месте. Выполняйте все шаги, которые не требуют света, такие как инкубация, отмывка в темноте.

Условия транспортировки:

The Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, содержащие какие-либо повреждения, свяжитесь с технической службой поддержки компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in Vitro**

Предназначен только для диагностики in vitro.

Vysis ToTelVysion Multi-Color Fish Probe Kit

Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[7].

Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[10].

ToTelVysion Mix от #1 до #10 и ToTelVysion Mix от # 11 до #15/

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Меры предосторожности при обращении:

- The Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit предназначен для использования с образцами, которые хранились и были обработаны как указано в инстукции.
- Не использовать пробу Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit по истечению срока годности.
- Строго следуйте инструкции. Несоблюдение инструкции приводит к ошибочным результатам.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

- Все биологические образцы должны рассматриваться как потенциально опасные инфекционные агенты. Поскольку зачастую невозможно знать, какой из агентов является потенциально опасным, все биологические образцы должны быть обработаны с соблюдением универсальных мер предосторожности.
- Следует избегать взаимодействия образцов с кислотами, сильными основаниями, или действию высоких температур. Такие условия могут привести к разрушению ДНК и к неправильным результатам FISH исследования.
- Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации, детекции может привести к недопустимым или ошибочным результатам исследования.
- Флуорофоры легко распадаются под действием света. Для предотвращения этого распада, храните слайды и пробы в темноте, и обработка всех слайдов и наборов зондов должна осуществляться в защищенном от света месте.
- Выполните все шаги, которые не требуют света (периоды инкубации, отмывки и т.д.) в темноте или при минимальном освещении.
- The Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit содержит формамид, тератоген. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Калибровочные термометры предназначены для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
- Всегда проверяйте температуру промывочных растворов перед использованием, измеряя температуру растворов в сосудах Коплина с калибровочными термометрами.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с правилами утилизации опасных веществ.

ВНИМАНИЕ Только для профессиональных пользователей**.** Определяющие опасность компоненты - формамид. Паспорта безопасности материалов (MSDS) на все реагенты получены и доступны в Службе технической поддержки Abbott Molecular.

АНАЛИЗ

Необходимые материалы

- Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit (15 флаконов, содержащих смесь различных проб).

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного • 1NNaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного • Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Магнитная мешалка
- Этанол 100%
- Микроцентрифуга
- Наконечники для дозаторов (от 1 до 10 мкл)
- Микродозаторы (от 1 до 10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC, 500 г (№02j10-032)
- NP-40, 4000 мкл (№07J05-001)
- Формамид высокоочищенный
- Контркраситель DAPI II
- Подогревательный столик
- Имерсионное масло для флуоресцетной микроскопии
- Резиновый клей
- Покровные стекла
- Резец алмазный
- Одноразовые шприцы
- Индикаторные pH-полоски
- Забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS)
- 10% нейтральный буферный формалин
- 2M хлорид магния (MgCl2)
- Протеаза/Пепсин

Подготовка реагентов

При необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20XSSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2XSSC/0,1 %NP-40 промывочный раствор

Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды.
Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте Ph и с помощью NaOH доведите его до 7.0±0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания

Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70% формамида/2X SSC)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Фиксирующие растворы формальдегида
Тщательно перемешать 37 мл раствора PBS и 12,5 мл 10% нейтрального буферного формалина и 0,5 мл 2M MgCl2.
Тщательно перемешать. Хранить при температуре от 2 до 8 С. Использовать в течении одной недели.

Раствор протеазы/пепсина
Смешать 25 мг лиофилизированного трипсина в 50 мл 0,01 N NaCl. Использовать сразу же.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах.
Использовать в течение 6 месяцев, затем утилизируйте.

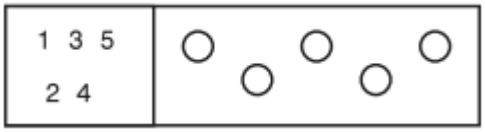
Указание по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
1. Сбор периферической крови должен производиться согласно лабораторным правилам.
2. Используя стандартные цитогенетические процедуры, приготовьте фиксированные клетки периферической крови, поместить их на предметные стекла и высушить.

Приготовление исследуемого препарата образца-мишени
Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость.
Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.

Внимание: Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции. Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

1. Проанализировать слайды используя контрастный микроскоп для идентификации регионов, которые содержат метафазные клетки, подходящие для FISH-анализа.
2. Для гибридизации всех 15 ToTelVysion смесей проб, использую минимум 3 образца слайда с 5 искомыми площадями на слайд для 15 в общей сложности целевых областей.
Обозначьте слайды условным обозначением, которое обеспечит простую идентификацию смеси зондов, нанесенную на каждую целевую область. Отметьте гибридизационную область с помощью маркера с ромбовидным наконечником для идентификации целевых областей, которые гибридизуются. Включите небольшую, примерно 12 мм круглую область на нижней стороне слайда. Чтобы максимально увеличить количество целевых областей на слайде для гибридизации зонда ToTelVysion и затем идентифицировать их, начертите пять кругов диаметром 12 мм. Используйте круглое покровное стекло диаметром 12 мм для покрытия этих областей во время гибридизации и после нанесения конткрасителя DAPI II.



Пример слайда #1, содержащий целевые области 1,2,3,4 и 5. Повторите тоже самое для организации целевых областей для слайдов 2 и 3 с пятью целевыми областями на каждом слайде.
В качестве альтернативы для образца можно использовать многоточечные предметные стекла диаметром 6 мм. Во время подготовки образца, нанесите клетки на слайды для концентрации метафазных клеток в областях, обведенных кружком. Проведите гибридизацию для областей, где метафазные клетки были утеряны. Избегайте гибридизации мишеней в лунках, которые находятся рядом друг с другом, поскольку

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

покровные стекла могут соприкасаться во время гибридизации, вызывая смешение зондов от одной мишени к другой из-за капиллярного взаимодействия.

Предподготовка образцов

Настоятельно рекомендуется следующая процедура перед гибридизацией пробы ToTelVysion на слайдах метафазных препаратов. Цель данной процедуры – это сделать доступной хромосомную ДНК для гибридизации и защита морфологии хромосом от процессов коденатурации.

1. Инкубировать образцы слайдов в сосудах Коплин, содержащем 2 Ч SSC Solution при 73 ° С в течение 2-х минут.
2. Инкубируйте слайды в сосудах Коплина, содержащего протеазу / пепсин в течение 10 минут при температуре 37 ° С.
3. Промойте слайды в сосудах Коплина, содержащих PBS при комнатной температуре в течении 5 минут.
4. Поместите слайды в сосуд Коплина, содержащего раствор формальдегида в течение 5 мин. при комнатной температуре.
5. Удалить слайды из раствора формальдегида и промыть в сосуде Коплина, содержащем PBS в течение 5 минут при комнатной температуре.
6. Обезвожить слайды в течение 1 минуты в 70% этаноле, а затем на 1 минуту в 85% этаноле, и 1 минуту в 100% этаноле.
7. Высушить слайды.

Процедура гибридизации и денатурации

ПРИМЕЧАНИЕ: Доведите температуру денатурационного раствора в сосудах Коплина до комнатной. Перенесите денатурационный раствор в водяную баню приблизительно на 30 минут перед использованием, чтобы температура достигла 73±1°С. Погрузите не более 4 слайдов в каждый сосуд с денатурационным раствором.

1. Убедитесь, что температура денатурационного раствора составляет 73±1°С, используя калибровочные термометры.
2. Погрузите предварительно обработанные слайды в раствор для денатурации при 73±1°С на 5 минут. Начните отсчет времени с того момента, когда последний слайд будет погружен в раствор.
3. Незамедлительно перенесите слайды в сосуды Коплина, содержащие 70% этанол и встряхивайте предметные стекла в течении 1-3 секунд, позволяя предметным стеклам оставаться в растворе не менее 1 минуты. Далее перенесите слайды из 70% этанола в 85% этанол минимум на одну минуту и затем в 100% этанол минимум на одну минуту.

Внимание: Держите образцы слайдов в 100% этаноле пока все слайды не высохнут и нанесите смесь зондов.

Подготовка Зонда и добавление смеси зонда на предметное стекло.

1. Каждая смесь из набора зондов ToTelVysion предварительно смешана и приготовлена в гибридизационном буфере. Извлеките пробирки из -20°С (±5°С). Оставьте при комнатной температуре.
2. Центрифугируйте каждый из размороженных флаконов со смесью зондов от 1 до 3 сек. на микроцентрифуге.
3. Отвортексируйте и снова отцентрифугируйте.
4. Извлеките 3 мкл пробы из флакона с помощью микропипетки и поместите в пробирку для микроцентрифуги. Для каждого из 15 флаконов подготовьте зонд таким же образом.
5. Поместите каждую микроцентрифужную пробирку, содержащую 3 мкл пробы на водяную баню 73±1°С на пять минут, чтобы денатурировать пробу.
6. Извлеките пробы с водяной бани.
7. Поместите пробирки на нагреватель для предметных стекол от 45°С до 50°С пока не будете готовы к нанесению зонда к целевой ДНК.

Внимание: Если слайды готовы, когда зонд денатурирован, вы можете незамедлительно нанести зонд к целевой ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру – поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37°C.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C на 2 минуты для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 3 мкл пробы к целевой области и накройте 12 мм покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.

Примечание: Не допускайте соприкосновения покровных стекол каждой целевой области. Капиллярное взаимодействие между соприкасающимися покровными стеклами может привести к тому, что один зонд от одной целевой области может перейти к другой.

5. Сформируйте при помощи резинового клея изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 12-24 часов.

Отмывка стекол

Приготовление промывочных растворов:

Примечание: Перед началом работы доведите температуру промывочных растворов до нужной.

- Налейте 70 мл 0,4XSSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1°C минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2XSSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

7. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
8. Извлеките стекла через 2 минуты.
9. Погрузите стекла в 2XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 50 секунд до 2 минут.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 3 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом. В качестве альтернативы нанесите 10 мкл контркрасителя DAPI II на каждую половину предметного стекла и поверх нанесите покровное стекло 22×50 мм поверх конткрасителя. Слегка надавите на верхнюю часть покровного стекла, чтобы удалить излишки DAPI. Промокните бумажным полотенцем.

Оценка слайдов

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Использование фильтров Vysis	Одновременное возбуждение и эмиссия
DAPI/Оранжевый/Зеленый тройной фильтр	DAPI, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорохром

Одиночный оранжевый	SpectrumOrange флуорохром
Одиночный зеленый	SpectrumGreen флуорохром
Одиночный голубой	SpectrumAqua флуорохром

Хранение: храните гибридизованные слайды при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте.

Ограничения в использовании

ToTelVysision оптимизирован для идентификации хромосомных локусов в метафазе из лимфоцитов периферической крови. Не предназначен для использования с околоплодными водами, другими пренатальными образцами или другими типами образцов.

Интерпретация результатов FISH должна производиться с учетом соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других данных клинико-диагностических исследований. Если получен атипичный образец сигнала FISH, любые смеси, производящие паттерны атипичных сигналов FISH, должны быть гибридизованы с известными нормальными метафазными хромосомами, чтобы гарантировать, что данный анализ работает должным образом. Сообщалось как о клинически значимых дисбалансах так и семейных вариантах, что связано атипичными субтеломерными шаблонами сигналов.[5,12]

Ожидаемые результаты

В нормальных метафазах, каждый сигнал пробы должен быть локализован в правильном цитогенетическом положении на гомологичных хромосомах.

Другие метафазные FISH сигналы считаются атипичными и должны быть подтверждены.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH-методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	*Вероятная Причина*	*Решение*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе пробоподготовки были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.

	Срезы были недостаточн высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь, что pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.

	Для визуализации гибридизации использованы фильтры со спектром полос пропускания длинных волн.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшим диапазоном полос или на фильтры с несколькими полосами.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH-методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH держите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH- методике (обработка трипсином и красителем Гимза (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.

	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC).

		Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте только такое количество образцов, которое сможете исследовать, и соблюдайте должную температуру и временные промежутки в соответствии с методикой исследования.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи резинового клея, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией.

		Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH – метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре - 20ºС или ниже, в защищенном от света месте Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºС или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре - 20ºС или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Использован неверны флуоресцентный краситель. Флуоресцентнй краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многопропускные фильтры дают меньше света, чем однопропускные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многопропускных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной

		информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите

	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (Номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при - 20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, et al. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nature Genet.* 1995;9:132-140.
2. Knight SJL, Regan R, Nicod A, et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* 1999;354(9191):1676-1681.
3. Flint J, Thomas K, Micklem G, et al. The relationship between chromosome structure and function at a human telomeric region. *Nature Genet.* 1997;15:252-257.
4. Biesecker LG. The end of the beginning of chromosome ends. *Am J Med Genet.* 2002;107:263-266.
5. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, et al. Subtelomere FISH analysis of 11688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet.* 2006;43:478-489.
6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections;—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. (ISBN 1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. Geneva: World Health Organization; 2004.
11. Barch MJ, ed. *The ACT Cytogenetics Manual.* 3rd ed. New York: Raven Press; 1999.
12. ACMG Practice Guideline: *American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation*. November/December 2005, Volume 7, Number 9.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

ToTelVysion разрешены на основании европейского патента 5, 663, 319, и 5, 491, 224 приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Vysis LSI, CEP и WCP зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами 5, 75, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детекции множественных сигналов гибридизации защищены американскими патентами 6, 203, 977, приписанного [2] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 E. Touhy Ave.
Des Plaines. IL 60018 USA

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2011, 2015 Abbott Laboratories
www. abbottmolecular.com
Июль 2015
30608472/4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit

en

REF 05N54-020

30-608292/R3

Vysis BCR/ABL1/ASS1
Tri-Color DF FISH Probe Kit
REF 05N54-020
30-608292/R3

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-10°C -30°C	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

ДНК-зонд Vysis BCR/ABL1/ASS1 трехцветный с двойным соединением (трехцветный ДНК-зонд) предназначен для детекции перестроек регионов 9q34 (LSI ASSABL), 22q11.2 (LSI BCR) с помощью флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Транслокация t (9;22) в результате слияния генов BCR на хромосоме 22q11.2 и гена ABL1 на хромосоме 9q34 детектируется цитогенетическими методами у более чем 80% пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ)[1]. В случаях ХМЛ при отсутствии возможности детектировать транслокацию цитогенетическими методами, слияние генов BCR/ABL1 почти всегда может быть обнаружено методом FISH и другими молекулярными методами. Слияние генов BCR/ABL1 также встречается в части случаев острого лимфолейкоза и реже острого миелоидного лейкоза[2].

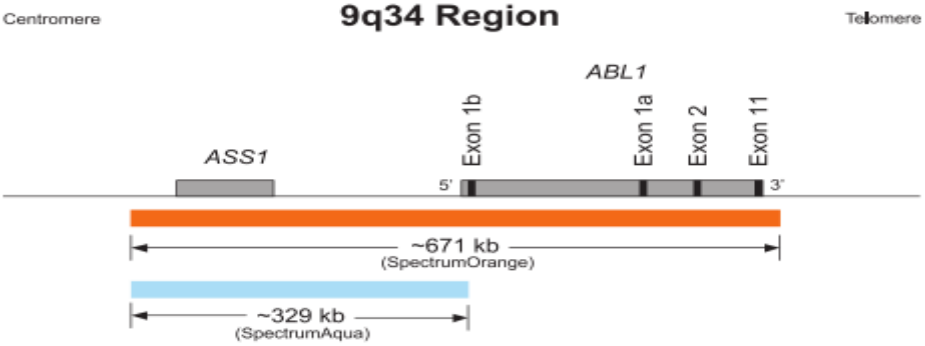
Примерно от 15 до 20% случаев ХМЛ, транслокация t (9;22) приводит к потере генетического материала, фланкирующего точки разрыва BCR и ABL1 на хромосоме 9[1,3]. Эта потеря может предотвратить производство высокоспецифичных сигналов двойного слияния, ожидаемых от двухцветных проб и сбалансированных транслокаций. Если оба целевых гена BCR и ABL1 удаляются с 9 хромосомы, низкоуровневое случайное перекрытие оранжевых и зеленых сигналов в нормальных клетках (производят один зеленый сигнал, один оранжевый и один слитный сигналы) нельзя отличить от низкоуровневого истинного слияния генов BCR/ABL1, производящие тот же паттерн сигналов. Трехцветный дизайн данной пробы - в данной пробе используется зонд третьего

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

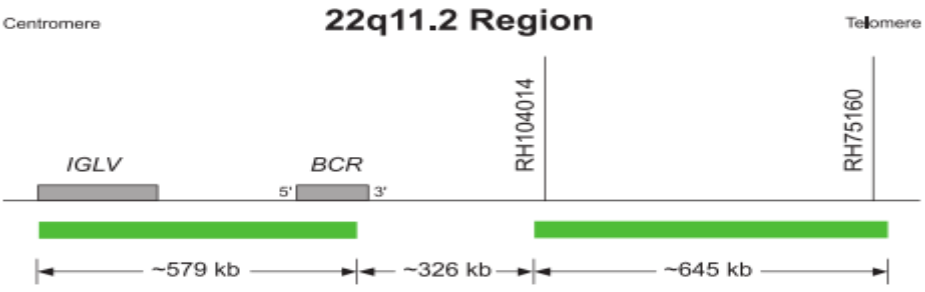
цвета (голубой) на центромерной стороне точки разрыва гена ABL1, который совмещен с оранжевым сигналом в случайном слиянии сигналов оранжевый/зеленый, но отсутствует в истинном слиянии генов BCR/ABL1 на хромосоме 22.
Зонды из данного набора использовались в опубликованных статьях для обнаружения низких уровней положительных клеток у пациентов с ХМЛ, которые проходили терапию и у которых была детектирована делеция сигналов FISH на хромосоме 9[1,3].

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

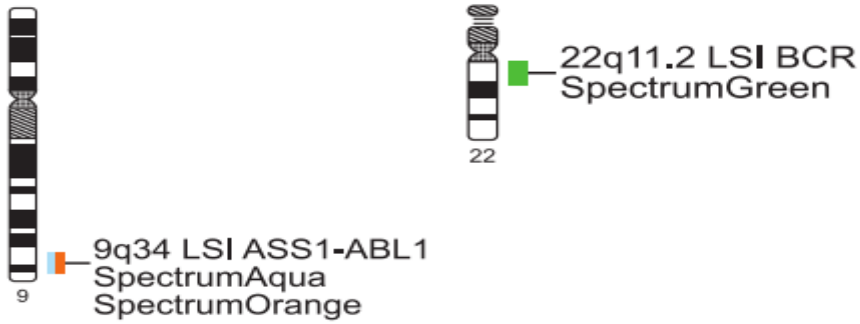
Размером приблизительно 671 Kb (chr9:132255025-132926107; Март 2006, UCSC, Геномный браузер)[4] SpectrumOrange LSI ABL1 зонд охватывает гены ABL1 и ASS1 на хромосоме 9q34. Размером приблизительно 329 Kb (chr9:132255025-132584487; Март 2006, UCSC, Геномный браузер)[4] SpectrumAqua LSI ASS перекрывает область, охватываемую зондом SpectrumOrange, захватывает ген ASS1 и лежит центромерно по отношению к точке разрыва региона гена ABL1.
Зонд SpectrumGreen LSI BCR проба состоит из двух зондов, локализованных на хромосоме 22q11.2. Центромерный сегмент пробы SpectrumGreen размером приблизительно 579 Kb (chr22:21382633-21962088; Март 2006)[4] и содержит большую часть гена BCR. Теломерный сегмент пробы SpectrumGreen размером приблизительно 645 Kb (chr22:22288218-22932815; Март 2006)[4] и лежит теломерно к точке разрыва региона гена BCR. Разрыв приблизительно 326 Kb между двумя пробами, меченными зеленым флуорохромом.



LSI ASS1-ABL1 Dual Fusion Probe



LSI BCR SpectrumGreen Dual Fusion Probe



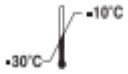
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 трехцветная проба (номер партии 30-231046) (1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 1062.5 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826) (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0). Таблицы с Данными о Безопасности Материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Хранение



Vysis **LSI BCR/ABL1/ASS1 трехцветная пробу** необходимо хранить при температуре -20°C (±10°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда **Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit** осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[4]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[7]

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура

Необходимые материалы (в комплекте)
- Vysis LSI BCR/ABL1/ASS Tri-Color Dual Fusion Probes
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид ультравысокой очистки
- Контрастирующий краситель DAPI II
- Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.
Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.
Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[5].

Ожидаемые результаты

Ожидаемый нормальный паттерн сигналов для зонда Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit это два оранжевых, два голубых и два зеленых сигнала. Ожидаемые атипичные паттерны сигналов для зонда Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit будет зависеть от деляционного статуса таргетной пробы, фланкирующей точки разрыва, являющиеся результатом производной 9 хромосомы.

- В сбалансированной транслокации t(9;22) без делеции таргетного региона на хромосоме 9, ожидаемые сигналы паттернов, это один оранжевый, один зеленый и один слитный сигналы. Один оранжевый сигнал, и один из двух слитных сигналов, будут иметь связанные голубые сигналы.
- Если таргетный регион гена ABL1 на хромосоме 9 потерян, ожидается один оранжевый, два зеленых и один слитный паттерн сигналов. Оранжевый сигнал будет иметь связанные голубые сигналы.
- Если таргетный регион гена BCR на хромоосме 9 отсуствует, ожидаемые сигналы это два оранжевых, один зеленый и один слитный сигналы. Оба оранжевых сигнала на нормальной 9 хромосоме и der хромосомы 9, отмечается связанный с ними голубой сигнал.
- Если оба таргетных гена ABL1 и BCR выпадают на der хромосоме 9, ожидается один оранжевый, один зеленый и один слитный сигналы. Опять же, один оранжевый сигнал (нормальная хромосома 9) будет иметь связанный голубой сигнал.

Во всех случаях истинный сигнал слияния генов BCR/ABL1 не будет иметь ассоциированного голубого сигнала, поскольку голубая проба лежит центромерно к точке разрыва гена ABL1 и таким образом не учувствует в слиянии онкогенных генов. Этот факт является основой для истинного отличия молекулярного слияния 5' BCR/ABL1 от другого слияния оранжевого и зеленого сигналов или они являются результатом der 9 или случайного перекрытия нормальных сигналов хромосом. Могут встречаться другие атипичные сигналы паттернов и метафазный анализ может быть полезен в характеристике таких паттернов. В публикациях Smoley et al[1] и Sui et al[3] использовали пробы, содержащиеся в этом наборе и продемонстрировали паттерны сигналов, наблюдаемые у пациентов с делециями.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ограничения процедуры

Для интерфазного анализа, индивидуальные лаборатории должны публиковать аналитически нормальный cut-off для атипичных паттернов сигналов и использованием соответствующих технологий, описанных Wiktor et al[5].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	FISH или фильтры микроскопа повреждены.	
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Smoley SA, Brockman SR, Paternoster SF, et al. A novel tricolor, dual-fusion fluorescence in situ hybridization method to detect BCR/ABL fusion in cells with t(9;22)(q34;q11.2) associated with deletionof DNA on the derivative chromosome 9 in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;148(1):1-6.

2. Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(FISH) in BCR/ABL leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia.* 2003;17(6):1124-9
3. Siu L, Ma E, Wong WS, et al. Application of tri-colour, dual fusion fluorescence in situ hybridization (FISH) system for the characterization of BCR-ABL1 fusion in chronic myelogenous leukaemia (CML) and residual disease monitoring. *BMC Blood Disord.* 2009;9:4.
4. Ken t WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
5. Wikt or 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
8. 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.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Адрес уполномоченного представителя
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
Телефон: +49-6122-580
E-mail: help@abbottmolecular.com

Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color Dual Fusion Probes защищены европейскими патентами EP 0 549 709 B1, приписанными Abbott Molecular.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abott. Все права защищены.
www. abbottmolecular. Com
Июль 2020
30-608292/R6

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CEP X SpectrumOrange/ Y SpectrumGreen DNA Probe Kit en

REF 07J20-050
07J22-050

30-608310/R3

CEP X SpectrumOrange/
Y SpectrumGreen DNA Probe Kit
REF 07J20-050; 07J22-050
30-608310/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Расчитан на n кол-во тестов
	Температурные ограничения
	Опасность
	Опасность
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042
Международная служба поддержки: Позвоните представителю Abbott

CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA Probe Kit (CEP X/Y)
(Номер партии 30-161050, Кат. номер 07J20-050)
(Номер партии 32-161050, Кат. номер 07J22-050)

Патентованное название
Набор флуоресцентных ДНК зондов CEP® X SpectrumOrange™/Y SpectrumGreen™ для прямого маркирования
Общее название
Реагенты для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH)Назначение

НАЗНАЧЕНИЕ
Набор флуоресцентных ДНК зондов CEP® X SpectrumOrange™/Y SpectrumGreen™ предназначен для детекции альфа сателлитной последовательности в центромерной области хромосомы X и сателлита III ДНК в области Yq12 хромосомы Y в сочетании с обычным диагностическим

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

цитогенетическим тестированием. Набор предназначен для использования в качестве дополнительного теста к стандартному цитогенетическому анализу для идентификации и количественного определения числа хромосом X и Y с помощью флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в интерфазных ядрах и метафазных пластинках, полученных из образцов костного мозга лиц, перенесших трансплантацию костного мозга от донора противоположного пола, при хронической миеломной лейкемии (CML), острой миелоидной лейкемии (AML), миелопролиферативных нарушениях (MPD), миелодиспластическом синдроме (MDS), острой и лимфоидной лейкемии (ALL) или гематологических нарушениях, не определенных специально (HDNOS). Набор не предназначен для использования в качестве самостоятельного анализа для сообщения результатов тестирования; результаты FISH могут сообщаться или интерпретироваться только лишь в сочетании с результатами стандартного цитогенетического анализа, проводимого одновременно с FISH с использованием тех же образцов пациента. Набора не предназначен для использования у пациентов, перенесших трансплантацию костного мозга, полученного от однополого донора, со стимулированными матрицами, для культивируемых образцов клеточного мозга или в скрининге анеуплоидов с конституциональными X и Y хромосомами.

Резюме и описание

При лечении многих гематологических злокачественных новообразований трансплантация костного мозга (ТКМ) представляет собой критическую стратегию терапии. Распространенные заболевания, при которых обычно проводится ТКМ, включают в себя хроническую миеломную лейкемию (CML), острую миелоидную лейкемию (AML), миелопролиферативные нарушения (MPD), миелодиспластический синдром (MDS), острую и лимфоидную лейкемию (ALL) и иногда хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL)[1,2]. Хотя многие индивиды, по-видимому, формируют стабильное химерное состояние между донором и реципиентом костного мозга, некоторые их них формируют нестабильное состояние, и злокачественное новообразование со временем появляется вновь с повышенным числом клеток реципиента, появляющихся в костном мозге или находящихся в периферической циркуляции.

После трансплантации изучение пропорции клеток донора и реципиента может использоваться для оценки успешности приживления трансплантата, детекции наличия клональных неоплазм и диагностики новообразований. Этот параметр особенно показателен при ТКМ от донора противоположного пола. Современные методы, использующиеся для оценки успешности приживления трансплантата, включают также стандартный цитогенетический анализ[3].

Стандартный цитогенетический анализ включает в себя кариотипирование клеточного мозга и идентификацию клеток донора и реципиента с помощью половой хромосомы или хромосомальных гетероморфных различий между донором и реципиентом. Метафазные пластинки готовятся из нестимулировнного костного мозга через 24-48 часов культивирования и окрашиваются красителями дигидрохлорид кинакрина или Giemsa с помощью общепринятых методик. Как правило, стандартный цитогенетический анализ проводится на 20-30 миотических клетках. У реципиентов с ТКМ от донора противоположного пола исследуется конституция половых хромосом в метафазных пластинках (XX=женщина, XY=мужчина). Если в образцах костного мозга от реципиентов с ТКМ от донора противоположного пола обнаруживают одну или несколько метафазных пластинок от донора, то образец считается положительным на донорские клетки. Соотношение клеток XX и XY может использоваться для оценки успешности приживления трансплантата. Уровень донорских клеток, составляющий 100%, обычно ассоциируется с полным приживлением трансплантата. Не имеют клинической значимости случаи, когда обнаруживается только одна метафазная пластинка, содержащая клетки реципиента.

Преимуществом стандартного цитогенетического анализа является тот факт, что если найдены клетки хозяина, для детекции отклонения от нормы хромосом лейкемических клонов могут использоваться «полосочные» методы. Последние применяются для документирования рецидива заболевания после трансплантации костного мозга. Однако стандартный цитогенетический анализ имеет ограничения при определении смешанного химеризма в малых пропорциях и требует исследования большого числа метафаз для повышения чувствительности определения[4]. Для исключения химеризма на 9% и более с 95%-ной вероятностью требуется анализ 32 метафаз[5]. Для исключения химеризма на 1% с 95%-ной вероятностью требуется анализ 459 метафаз[5]. С практической точки зрения сложно исключить химеризм с уровнем менее 10% с помощью стандартного цитогенетического анализа. Более того, для кариотипического анализа требуются активно делящиеся клетки, и таким образом он ограничивается клеточными популяциями, находящимися в стадии пролиферации. Отсутствие делящихся клеток в результате мозговой гипоцеллюлярности является первичной причиной неудачи при проведении стандартного цитогенетического анализа.

Использование FISH наряду со стандартным цитогенетическим анализом может обеспечить более высокий уровень аналитической чувствительности благодаря легкости анализа большого числа

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

клеток; как правило, в любом образце можно проанализировать по крайней мере 500 интерфазных ядер. В связи с возможностью анализа большого количества клеток и повышения аналитической чувствительности FISH анализа, анализ FISH должен обеспечивать большую воспроизводимость оцениваемого соотношения донорских клеток и клеток реципиента по сравнению со стандартным цитогенетическим анализом. Однако это довольно сильно зависит от степени чистоты используемых реагентов, оптимальных условий проведения анализа в лаборатории, а также от принятия наиболее оптимальных результатов.

Принципы процедуры

Гибридизация in situ представляет собой метод, позволяющий визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот без специальной подготовки клеток. Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) включает в себя прецизионный отжиг односпирального ДНК зонда к комплиментарным объектным последовательностям. Гибридизация зонда с клеточным ДНК сайтом визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа.

Ткань, состоящая из интерфазных ядер и метафазных пластинок, наносится на стеклянные предметные стекла с помощью стандартных цитогенетических методик. Полученная ДНК из образца денатурируется до одноцепочечной формы и гибридизуется с CEP X/Y ДНК зондом. После гибридизации избыток зонда и не прореагировавшие зонды удаляются путем нескольких промывок, и хромосомы и ядра окрашиваются с помощью ДНК специфического красителя DAPI (4,6 диамидин-2-фенилиндола), который дает синюю флуоресценцию. Гибридизация CEP X/Y ДНК зонда визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами, позволяющими наблюдать интенсивный оранжевый флуоресцентный сигнал, концентрированный в центромере хромосомы X, интенсивный зеленый флуоресцентный сигнал, концентрированный в области Yq12 хромосомы Y, а также хромосому и ядра, окрашенные в синий цвет. Подсчет числа X и Y хромосом проводится путем исследования под микроскопом интерфазных и/или метафазных ядер. Флуоресцентно окрашенные центромеры хромосомы X и сателлита III ДНК хромосомы У ярко проявляются на фоне общей синей флуоресценции ядерных ДНК, которая обеспечивается красителем DAPI. По сравнению со стандартным цитогенетическим анализом CEP процедура обеспечивает более высокий процент интерпретируемых ядер в расчете на одно покровное стекло и позволяет определить количество X и У хромосом внутри ядер.

Результаты анализа выдаются как процент ядер с X, У, XУ, XX и другими сигналами среди всех клеток, дающих хотя бы один флуоресцентный сигнал. Каждый оранжевый флуоресцентный сигнал соответствует центромеру хромосомы X, каждый зеленый сигнал соответствует сателлиту III ДНК хромосомы У.

CEP X ДНК зонд (DXZ1 локус) представляет собой флуоресцентный ДНК зонд, непосредственно меченный красителем SpectrumOrange, который является специфичным для альфа сателлитной ДНК последовательности, обогащенной AT, на центромерном участке хромосомы X (Xp11.1-Xq11.1). CEP Y ДНК зонд (DYZ1 локус) представляет собой флуоресцентный ДНК зонд, непосредственно меченный красителем SpectrumGreen, который является специфичным для сателлита III ДНК на Yq12 участке хромосомы Y. Данный анализ разработан для детекции и количественного определения хромосом X и У как в интерфазных ядрах, так и метафазных пластинках с помощью флуоресцентной гибридизации in situ.

Реагенты и приборы

Материалы, входящие в набор

Набор содержит четыре реагента в количестве, достаточном для проведения приблизительно 20 анализов. За один анализ принимается анализ участка-мишени размером 22 x 22 мм.

Таблица 1

Таблица 1. Набор зондов CEP® X SpectrumOrange™/Y SpectrumGreen™ (№ партии 30-161050, Кат номер 07J20-050) Таблица 1

- ДНК-зонд CEP X/У плазмида *E. coli* (зонд предварительно денатурирован) Vysis Кат. No: 30-171050

Количество: 220 мкл в одном флаконе

Хранение: -20°C в темном месте

Состав: Меченный флуорофором SpectrumOrange (оранжевая окраска) альфа-сателлитный X ДНК-зонд и меченный флуорофором SpectrumGreen (зеленая окраска) У III ДНК-зонд, предварительно смешанные в ДНК блокирующем и гибридизационном буфере (сульфат декстрана, формамид, SCC)

- **DAPI II краситель**

Vysis Кат. No: 30-804841

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Количество: 300 мкл в одном флаконе
Хранение: -20°C в темном месте
Состав: 125 нг/мл DAPI (4,6-диамидин-2-фенилиндол) в фенилендиамин дигидрохлориде, глицерине и буфере

- **NP-40**

Vysis Кат. No: 30-804818
Количество: 1 мл в одном флаконе
Хранение: от -20°C до 25°C
Состав: NP-40

- Соли 20X SSC

Vysis Кат. No: 30-805850
Количество: 66 г в одном контейнере
Хранение: от -20°C до 25°C
Состав: хлорид натрия и цитрат натрия

Таблица 2 Набор, содержащий контрольные стекла, номер партии 32-161050, кат. номер №. 07J22-050 Содержимое набора включает следующие стекла дополнительно к компонентам, перечисленным выше.

- ProbeChek контрольные стекла с мужским контролем, низкий уровень, 5% XY/95%XX

Vysis Кат. No: 30-805012
Количество: 5 стекол (10 областей-мишеней)
Хранение: -20°C в темном месте в герметично закрытом контейнере с осушителем для защиты от влажности.
Состав: Фиксированные культивированные лимфобластные мужские и женские клетки человека с соответствующим соотношением (примерно 5% мужских клеток и 95% женских клеток), нанесенные на предметные стекла для микроскопии.

- ProbeChek контрольные стекла с женским контролем, низкий уровень, 95% XY/5%XX

Vysis Кат. No: 30-805011
Количество: 5 стекол (10 областей-мишеней)
Хранение: -20°C в темном месте в герметично закрытом контейнере с осушителем для защиты от влажности.
Состав: Фиксированные культивированные лимфобластные мужские и женские клетки человека с соответствующим соотношением (примерно 5% женских клеток и 95% мужских клеток), нанесенные на предметные стекла для микроскопии.

Хранение и обращение с набором

Невскрытый набор ДНК зондов CEP X/Y следует хранить при -20°C в сухом и защищенном от света и влажности месте. Соли 20X SSC и NP-40 можно хранить отдельно при комнатной температуре. Контрольные стекла ProbeChek хранят при -20°C в темном месте в герметично закрытом контейнере с осушителем для защиты от влажности. Срок годности каждого невскрытого компонента набора указан на его этикетке. Эти требования к условиям хранения относятся и к вскрытым, и к невскрытым компонентам.

Необходимые материалы, не входящие в набор

Лабораторные реагенты

- Формамид сверхчистый. Хранить при 4ºC в течение одного месяца с момента получения (см. рекомендации производителя).
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированная соляная кислота (12N) (HCl)
- 1N NaOH
- Очищенная воды (дистиллированная, деионизованная или обработанная на Milli-Q)
- Фиксатор(3:1 (v:v) метанол:ледяная уксусная кислота)
- Drierite и газообразный азот

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Лабораторное оборудование

- Флуоресцентный микроскоп, снабженный рекомендуемыми фильтрами
- Фазово-контрастный световой микроскоп
- Предварительно вымытые предметные стекла для микроскопа
- Нагреватель для стекол (45-50°C)
- Покровные стекла 22 x 22 мм
- Микролитровая пипетка (1-10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0,5 или 1,5 мл)
- Таймер
- Магнитная мешалка
- Мешалка вортекс
- Микроцентрифуга
- Градуированный цилиндр
- Водяные бани (67±2°C, 73±1°C)
- Воздушный инкубатор (42°C)
- Алмазный резец
- Увлажненная камера для гибридизации
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Емкости Коплина (6). Рекомендуемый тип: Wheaton, Кат. No. 900620, емкость для вертикального окрашивания
- pH-метр и бумажные pH-полоски
- Градуированный термометр
- Коробка для предметных стекол с крышкой
- Резиновый герметик
- Фильтр с порами 0,45 мкм

Микроскоп и дополнительные принадлежности

Микроскоп: Эпи-флуоресцентный микроскоп необходим для оценки результатов гибридизации. *Если флуоресцентный микроскоп уже имеется, нужно убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальную визуализацию образцов, анализируемых с помощью флуоресцентной гибридизации in situ*. Микроскоп, который используется с обычными красителями ДНК (DAPI, йодид пропидия и хинакрин) могут не подойти для FISH-анализа. Рекомендуется проводить рутинную чистку микроскопа, а также периодическую настройку техническим представителем производителя.

***Примечание**: Часто вместо предполагаемого плохого качества реагентов при анализе in situ на самом деле имеет место неисправная работа флуоресцентного микроскопа или использование несоответствующих фильтров.*

Источник возбуждающего света: Рекомендуется ртутная лампа на 100 Вт со сроком службы около 200 часов. Записывайте время использования лампы и замените ее до истечения номинального срока годности. Убедитесь, что лампа юстирована.

Объективы: При работе с микроскопом с ртутной лампой на 100 Вт используйте иммерсионные флуоресцентные объективы с апертурой ≥0,75. Для сканирования подходит объектив 40X в сочетании с окулярами 10X. Удовлетворительные результаты FISH-анализа могут быть получены при использовании иммерсионных ахроматических объективов 63X или 100X.

Иммерсионное масло: С иммерсионными объективами используйте иммерсионное масло с низкой фоновой флуоресценцией и предназначенное специально для флуоресцентной микроскопии.

Фильтры: Комплект фильтров для флуоресцентного микроскопа с несколькими полосами пропускания, оптимизированных для использования с наборами ДНК-зондов CEP, можно приобрести у Vysis для большинства моделей микроскопов. Для работы с набором CEЗ X/Y рекомендуется использовать комплект фильтров с тройной полосой пропускания

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

DAPI/Green/Orange. Места гибридизации зондов CEP X/E с их областями-мишенями отмечаются оранжевой и зеленой флуоресценцией. Вся остальная ДНК будет иметь синюю флуоресценцию из-за красителя DAPI.

Подготовка рабочих растворов реагентов

20X SSC

Для приготовления 20X SSC pH 5.3, смешайте:

66 г	20X SSC
200 мл	очищенной воды
250 мл	конечный объем

Тщательно размешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите pH до 5.3 с помощью концентрированной соляной кислоты. Доведите общий объем до 250 мл очищенной водой. Профильтруйте через фильтрационное устройство с диаметром пор 0.45 мкм. Храните при комнатной температуре до 6 месяцев.

Раствор для денатурации (

70%-ный формамид / 2X SSC, pH 7,0-8,0)

Для приготовления раствора для денатурации смешайте:

49 мл	формамида
7 мл	20X SSC, pH 5,3
14 мл	очищенной воды
70 мл	итоговый объем.

Тщательно перемешайте. С помощью pH-метра со стеклянным электродом измерьте pH при комнатной температуре, чтобы убедиться, что она в пределах 7,0-8,0. Раствор можно использовать в течение 1 недели. Проверяйте pH перед каждым использованием. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере.

Спиртовой промывочный раствор

Приготовьте 70% и 85% (об./об.) растворы спирта из 100% этанола и очищенной воды. Разведенный спирт можно использовать в течение одной недели, если не происходило испарения или раствор не становился более разбавленным в результате интенсивного использования. Храните не использующийся раствор при комнатной температуре в плотно закрывающейся емкости.

0.4X SSC промывочный раствор

Для приготовления смешайте:

20 мл	20X SSC, pH 5.3
950 мл	очищенной воды
1000 мл	конечный объем

Тщательно размешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите pH до 7.0-7.5 с помощью 1N NaOH. Доведите общий объем до 1 л очищенной водой. Профильтруйте через фильтрационное устройство с диаметром пор 0.45 мкм. Выливайте использованный раствор в конце каждого дня. Храните при комнатной температуре до 6 месяцев.

0.1% NP-40 в 2X SSC

Для приготовления смешайте:

100 мл	20X SSC, pH 5.3849 мл
849 мл	очищенной воды
1 мл	NP-40
1000 мл	конечный объем

Тщательно размешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите pH до 7.0 - 7.5 с помощью 1N NaOH. Доведите общий объем до 1 л очищенной водой. Профильтруйте через фильтрационное устройство с диаметром пор 0.45 мкм. Выливайте использованный раствор в конце каждого дня. Храните при комнатной температуре до 6 месяцев.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

1. Набор предназначен только для диагностики in vitro.
2. Контрольные препараты ProbeChek из этого набора приготовлены из лимфобластоидных клеточных линий человека, фиксированных несколько раз в растворе 75% метанола/25% уксусной кислоты. *Часто невозможно убедиться в инфекционной безопасности образца, поэтому со всеми образцами человека и контрольными препаратами следует обращаться, соблюдая универсальные меры предосторожности. Руководство по обращению с такими образцами можно получить в Центрах контроля и профилактики заболеваний США*[6].
3. Условия гибридизации могут изменяться при использовании других реагентов, кроме реагентов, поставляемых Vysis, Inc.
4. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и детекции может привести к получению неприемлемых или неправильных результатов.
5. Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Это относится и ко всем этапам работы с гибридизованными препаратами. Проводите все манипуляции, не требующие света (инкубация, промывка и т.д.), в темноте.
6. CEP X/Y ДНК-зонд содержит формамид — тератоген. Не допускайте его контакта с кожей и слизистыми.
7. Измерение температуры растворов, водяных бань и инкубаторов следует проводить градуированными термометрами.
8. Все опасные материалы следует утилизировать в соответствии с местными и государственными правилами.

CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[11], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[12], CLSI документ M29-A3[13], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[14]. Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[11]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[14]

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

NP-40

H302	Опасно при попадании внутрь
H318	Может вызвать серьезное повреждение глаз
H412	Опасно для водных организмов с отдаленными последствиями
P280	Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/защиту для глаз
P264	Тщательно мойте руки после работы
P273	Избегайте попадания в окружающую среду
P305+ P351+ P338	При попадании в глаза: Промойте водой в течении нескольких минут. Снимите контактные линзы, если носите, чтобы обеспечить доступ. Продолжайте промывать .
P501	Материалы и емкости должны быть утилизированы безопасным способом.

Информация о Паспортах Безопасности: важная информация о безопасности, обращении, транспортировке и утилизации данного продукта содержится в Паспортах безопасности.

Паспорта безопасности для всех реагентов (MSDS), входящих в наборы, доступны по запросу в Службе Технической Поддержки (1-800-553-7042 в США и за пределами США +49-6122-580).

Сбор образцов, обработка, хранение и подготовка препаратов на стеклах

Получение и обработка образцов

Сбор костного мозна необходимо проводить в соответствии с лабораторными правилами, В учебнике АСТ цитогенетической лаборатории содержатся рекомендации по сбору образцов и их культивированию[7]. В соответствии с правилами АСТ рекомендуется проводить сбор костного мозга либо в транспортной среде на основе натриевой соли гепарина, либо в вакутейнер с натриевой солью гепарина[7]. По правилам АСТ оба варианта являются приемлемыми. Образцы костного мозга не должны быть контаминированы кровью в значительном количестве, так как ее присутствие может разбавить костный мозг и повлиять на результаты анализа соотношения донор/реципиент.
В соответствии с правилами АСТ рекомендуется, чтобы образцы, предназначенные для отправки в цитогенетическую лабораторию, и культуры костного мозга были немедленно инициированы. В АСТ учебнике содержатся рекомендации по культивированию и сбору клеток. Перед культивированием и сбором костный мозг нельзя замораживать. Собранные клетки костного мозга могут сразу использоваться для приготовления стекол или могут храниться в фиксаторе при –20ºС[7].
Иктерические или гемолизированные образцы могут препятствовать получению культур, приемлемых для цитогенетического анализа. Не допускайте воздействия кислот, сильных оснований и чрезмерного тепла на препараты. Все это может привести к повреждению ДНК и получению неправильных результатов FISH.

Приготовление препаратов фиксированных клеток на предметных стеклах

Для приготовления стекол из культивированных образцов может использоваться следующая методика:
1. Поместите водяную баню и влажную камеру во влагонепроницаемый контейнер с фронтальным доступом. Плотно укройте переднюю часть контейнера пластиковым упаковочным материалом таким образом, чтобы не блокировать полностью доступ вовнутрь. Если комнатный гигрометр показывает значение меньше 45%, влажную камеру можно использовать.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Предварительно нагрейте водяную баню до 67±2°C. Поместите штативы с пробирками по центру водяной бани так, чтобы они не касались стенок бани. Поддерживайте уровень воды в водяной бане по верхнему краю штатива на протяжении всей процедуры.
3. Подготовьте суспензию клеток с фиксатором Карноя так, чтобы суспензия слегка опалесцировала.
4. Промойте предметные стекла для микроскопа путем орошения обеих сторон стекла 70% этанолом (используйте сжимаемую пластиковую емкость). Вытрите стекла досуха с помощью промокательной бумаги по всей длине стекла с помеченного конца. Промаркируйте стекла с помощью алмазного резца. Используйте карандаш для нанесения маркировки в виде цветной насечки.
5. Погрузите промытое стекло в емкость Коплина с фиксатором Карноя. Поворачивайте стекло для равномерного нанесения фиксатора на его верхнюю поверхность.
6. Выньте и держите стекло над водяной баней. С помощью пастеровской пипетки нанесите 3 – 4 капли образца клеточной суспензии по всей длине стекла.
7. Поместите стекло образцом кверху наверх штатива для пробирок в водяной бане. Сушите стекло 10 минут.
8. Выньте стекло из штатива и просмотрите его под микроскопом с фазовым контрастом. Определите число интерфаз на поле при низком разрешении (10X объектив). Для получения оптимальных результатов анализа требуется, чтобы в поле при низком разрешении находилось минимум 100 клеток. Добавьте необходимое количество свежего фиксатора Карноя в клеточную суспензию для получения рекомендуемого числа интерфазных ядер.
9. Аккуратно очертите область, содержащую интерфазные ядра, на обратной стороне стекла с помощью алмазного резца. Поскольку для образования зоны гибридизации будет использоваться покровное стекло с размерами 22 мм x 22 мм. Очерченная зона должна соответствовать этим размерам. На одно предметное стекло можно помещать до двух покровных стекол.
10. Поместите стекла с образцами в пенал для хранения стекол.
11. Перед проведением гибридизации или хранением выдержите стекла с образцами при комнатной температуре в течение суток в закрытом пенале.

Хранение предметных стекол

Храните подготовленные предметные стекла в закрытом пенале при -20°C до проведения гибридизации. Поместите пенал в пластиковый мешок, наполненный газообразным азотом и содержащий примерно одну столовую ложку Drierite.

Процедура анализа

Краткое описание процедуры флуоресцентной гибридизации in situ

Денатурация ДНК в образце

1. Заранее подогрейте до 42°C камеру для гибридизации (воздухонепроницаемый контейнер), поместив ее перед подготовкой препаратов в инкубатор с температурой 42°C.
2. Налейте раствор для денатурации в емкость Коплина и поместите на водяную баню с температурой 73±1°C по крайней мере на 30 минут. Проверьте температуру раствора перед использованием.
3. Проведите денатурацию ДНК в образце, погрузив подготовленные стекла в раствор для денатурации с температурой 73±1°C (≤4 стекол на 1 емкость Коплина) на 5 минут. Не проводите денатурацию более 4 препаратов в одной емкости Коплина одновременно.
4. С помощью пинцета извлеките стекла из раствора для денатурации и сразу погрузите их в промывочный раствор 70%-ного этанола комнатной температуры. Поболтайте стекло для удаления формамида. Оставьте стекла в этаноле на 1 минуту.
5. Извлеките стекла из 70%-ного этанола. Повторите этап 4 с 85%-ным этанолом, а затем — 100%-ным этанолом.
6. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла лабораторной салфеткой.
7. Просушите стекла на нагревателе для стекол в течение не более 2 минут при 45-50°C, пока вы не будете готовы добавить раствор зондов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

***Примечание**: Если в процессе проведения гибридизации на подготовку зондов может понадобиться более двух минут, стекло необходимо оставить в емкости со 100% спиртом. Не давайте стеклу высохнуть на воздухе перед его помещением в нагреватель для стекол.*

Подготовка зондов

1. Дайте раствору зондов прогреться до комнатной температуры, пока его вязкость не уменьшится достаточно для точного пипетирования.
2. Перемешайте на вортексе. Отцентрифугируйте каждую пробирку в течение 1-3 секунд с помощью настольной микроцентрифуге, чтобы содержимое пробирки стекло на дно пробирки. Снова аккуратно перемешайте на вортексе.

Гибридизация

1. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную область-мишень стекла. Сразу накройте эту область покровным стеклом размером 22 х 22 мм и дайте смеси равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха мешают гибридизации, поэтому не допускайте их образования.

***Примечание**: Не добавляйте раствор зондов на область-мишень, пока не подготовлены покровные стекла.*

2. Поместите стекла в предварительно нагретую до 42°C камеру для гибридизации и плотно закройте камеру крышкой.
3. Поместите камеру со стеклами в инкубатор, нагретый до 42°C как минимум на 30 минут, чтобы прошла гибридизация.

***Примечание**: Более длительная гибридизация может потребоваться для повышения интенсивности сигнала в некоторых образцах. Инкубацию можно проводить в течение ночи (до суток). При инкубации, превышающей 1 час, покровные стекла следует заклеить с помощью резинового герметика, и гибридизационная камера должна быть увлажнена. Процедура описана ниже:*

- Наберите герметик в шприц на 5 мл. Выдавите его небольшое количество по краям покровного стекла, захватывая и покровное, и предметное стекла, формируя таким образом изолирующий слой вокруг покровного стекла.
- Поместите стекла в увлажненную камеру для гибридизации (воздухонепроницаемый контейнер с кусочком влажной фильтровальной бумаги размером около 1 х 3 дюйма).
- Плотно закройте камеру крышкой и инкубируйте в течение 1-16 часов.
- После инкубации удалите резиновый герметик с покровного стекла.

Промывка после гибридизации

1. Налейте 0.4X SSC (pH 7.0-7.5) в емкость Коплина. Подогрейте буфер, поместив емкость Коплина на водяную баню с температурой 73±1°C по крайней мере на 30 минут, или пока раствор не нагреется до 73±1°C.

***Примечание:** Если предполагается провести гибридизацию более 4-х стекол, их следует промывать в несколько партий. Промывочный раствор следует нагревать до 73±1° С перед промывкой каждой партии.*

2. Снимите покровное стекло с области-мишени первого стекла, и немедленно перенесите стекло в емкость Коплина, содержащую 0.4X SSC при температуре 73±1°C. Поболтайте стекло в буфере в течение 1-3 секунд. Повторить операцию для остальных трех стекол и инкубировать 2 мин при 73±1°C.

***Примечание**: Не снимайте покровные стекла с нескольких предметных стекол перед их помещением в промывочную баню. Начните 2-минутный отсчет инкубации, когда последнее стекло будет добавлено в промывочную баню.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Извлеките каждое стекло из промывочной бани и поместите их в емкость, содержащую 2X SSC/0.1% NP-40, при комнатной температуре на 5-60 сек, встряхивая их в течение 1-3 сек после помещения в баню.
4. Высушите стекла на воздухе в темноте в вертикальном положении. (Подойдет закрытый ящик или полка внутри закрытого шкафа.)
5. Нанесите 10 мкл красителя DAPI IIна отмеченную область стекла и накройте покровным стеклом. До проведения подсчета храните препараты в темном месте.

Хранение препаратов
Гибридизованные препараты (с покровными стеклами) храните при -20°C в темном месте. При этих условиях стекла могут храниться до 12 месяцев без существенной потери интенсивности флуоресцентного сигнала. При длительном хранении покровные стекла можно заклеить герметиком для предотвращения испарения, и предметные стекла храните при -20°C.

Подсчет сигналов
Оценка приемлемости препарата
Приемлемость препарата оценивается по следующим критериям:

- Интенсивность сигнала зонда: сигнал должен быть ярким, четким и легко оцениваемым. Сигналы должны быть в форме либо яркого овала с четкими границами, либо вытянутого овала с расплывчатыми границами.
- Фон: фон должен быть темным или черным и относительно свободным от флуоресцирующих частиц или помутнений.
- Специфичность объектной области в отношении перекрестной гибридизации: Зонд должен гибридизоваться и окрашивать только объектную область (центромер X хромосомы или Yq12 область Y хромосомы). Метафазные пластинки следует исследовать для идентификации любой перекрестной гибридизации необъектных последовательностей. По крайней мере, 98% клеток дают один или более сигналов для приемлемой гибридизации (см. правила по подсчету сигналов, описанные ниже).

Если любой из выше перечисленных признаков не удовлетворяет критериям приемлемости, обратитесь к разделу по устранению возможных проблем (Таблица 1) и приготовьте новый препарат.

Выбор оптимального для анализа участка и ядер, подлежащих оценке
Для просмотра гибридизованной области и определения подходящего участка используйте объектив 25X. Выбирайте области, в которых образец распределен равномерно, лишь несколько интерфазных ядер или метафазных пластинок могут перекрываться, и несколько интерфазных ядер или метафазных пластинок могут быть просканированы в поле обозрения. Не анализируйте ядра с нечеткими границами. Пропускайте ядра с сомнительными сигналами, требующими субъективного решения. Пропускайте сигналы слабой интенсивности и неспецифичные, а также при фоновых помехах. Пропускайте ядра, недостаточно окрашенные для определения их границ. Подсчитывайте только клетки с дискретными сигналами.

Сканирование при подсчете сигналов
С помощью объектива 40X или 63X начните анализ верхнего левого квадранта выбранной зоны и, сканируя слева направо, подсчитайте число сигналов в каждой доступной метафазной пластинке или внутри границ ядер в каждой доступной интерфазной клетке. Зоны на стекле с высокой плотностью клеток следует отбросить для того, чтобы просканировать всю область-мишень. Продолжайте сканирование до тех пор, пока не будет просчитано и проанализировано 500 интерфазных ядер и минимум 20 метафазных пластинок. Если в более чем 5% ядер не было гибридизационного сигнала после подсчета 200 ядер, данное стекло следует обозначить как неудавшаяся гибридизация и результаты по данному стеклу не сообщаются.

Подсчет интерфазных сигналов
Подсчитайте число флуоресцентных сигналов в каждом доступном интерфазном ядре с помощью объектива 40X или 63X. Следуйте правилам подсчета сигналов таблицы 1. Объективы с большим

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

разрешением (например, 63X или 100X) должны использоваться для разрешения спорных случаев расщепления или размытости сигналов.

- Два сигнала примерно одинакового размера, находящиеся друг от друга на близком расстоянии, но не имеющих видимого соединения, считаются как два сигнала.
- Считайте размытый сигнал как один сигнал, если сигнал непрерывный и в приемлемых границах.
- Два малых сигнала, имеющих видимое соединение, считаются как один сигнал.
- Посчитайте число ядер с 0, 1, 2, 3, 4 или >4 сигналов (как для X, так и для У сигналов) и внесите полученное количество сигналов в двунаправленную таблицу. Посчитайте ядра с одним или более FISH-сигналом каждого цвета. Если точность подсчета сомнительна, повторите подсчет в другой области стекла.
- Не учитывайте ядра с неясными сигналами.

Подсчет метафазных сигналов

- Метафазные пластинки должны иметь хромосомы, которые хорошо отделены друг от друга, но имеют происхождение из одной клетки. Выберите минимум 20 полных метафазных пластинок хорошего качества с четко определенными не перекрывающимися хромосомами для подсчета и анализа хромосом.
- Сигнал зонда CEP X/У ДНК проявляется в виде четкого флуоресцентного сигнала, локализованного около центромерной области X хромосомы и Yq12 области хромосомы У. Сигнал CEP может быть расщеплен (два малых сигнала на близком расстоянии друг от друга) в случае разделения хроматид. Разделение хроматид происходит, когда клетка находится на боле поздних стадиях митоза (между метафазой и анафазой). Расщепленный сигнал, найденный на каждой из двух хроматид, должен учитываться как один сигнал. См. правила сканирования в разделе «Подсчет интерфазных сигналов».
- Дополнительно к сигналам X/У к метафазным клеткам должен иметься доступ для подтверждения специфичности зондов к локусу, чтобы убедиться в отсутствии перекрестно гибридизующихся последовательностей в альтернативных местах нахождения хромосом.

Таблица 3
Возможные проблемы и их устранение

Проблема	Возможная причина	Решение
• Отсутствие сигнала или слабый сигнал	• Использовался несоответствующий комплект фильтров	• Используйте рекомендуемые фильтры
	• Неправильная работа микроскопа	• Свяжитесь с техническим представителем фирмы-производителя микроскопа • Используйте ртутные лампы (желательно на 100 Вт)
	• Использованы несоответствующие лампы (ксеноновые или вольфрамовые)	• Установите новую лампу
	• Использованы ртутные лампы с истекшим сроком службы	• Отъюстируйте ртутную лампу • Промойте или замените линзы
	• Ртутная лампа не юстирована	• Промойте или замените зеркало
	• Коллекторные линзы загрязнились или треснули	• Проверьте температуру водяной бани (73±1°C)
	• Зеркало в корпусе для лампы загрязнилось или разбито	• Проверьте температуру в инкубаторе (42°C)
	• Пробы денатурированы неправильно	• Увеличьте время гибридизации как минимум до 1 часа
	• Не соблюдены условия гибридизации	• Проверьте температуру водяной бани (73±1°C) • Проверьте состав раствора для водяной бани (например pH)
	• Неправильные условия промывки	• Покровное стекло должно наноситься сначала путем прикосновения к поверхности гибридизационной смеси • Хранить при -20°C в темноте
	• Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, которые затрудняют доступ для зондов	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Не соблюдены условия хранения проб	
• Низкая специфичность сигнала	• Неправильные условия гибридизации • Слишком низкая температура промывки	• Проверьте температуру в инкубаторе (42°C) • Поддерживайте температуру промывки при 73±1°C
• Фоновые помехи на стеклах	• Метафазные пластинки содержат слишком много цитоплазмы • В клеточных препаратах находится клеточный дебрис • ДНК в образцах недостаточно чистая • Использование широкополосного фильтра, пропускающего много света • Промывание при неправильной температуре или неправильным составом промывочного раствора • Стекла промыты недостаточно перед нанесением на них клеток-мишеней	• Увеличьте время денатурации стекол до 10 мин. • Промойте клеточный препарат 5 раз свежим фиксатором и повторите процедуру нанесения • Замените промывочный раствор после гибридизации 0.4X SCC промывочным раствором на основе формамида следующим образом: 1. промыть стекла 3 раза в течение 10 мин каждое в растворе 50% формамида/2X SSC, pH 7.5-8.0 при 46±1°C 2. промыть стекла 1X раз в течение 10 минут в 2X SSC при 46±1°C 3. промыть стекла 1X раз в течение 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при 46±1°C • Замените на фильтр с более узкой полосой пропускания или фильтр с несколькими полосами пропускания • Проверьте температуру бани, pH и/или состав • Замочите стекла в этаноле и просушите с помощью фильтровальной бумаги перед нанесением клеток
• "Искаженная морфология хромосом	• Слишком быстрая сушка стекол в процессе подготовки образцов • Стекла не готовы к проведению денатурации • Стекла недостаточно хорошо высушены перед денатурацией • Слишком высокая температура в бане для денатурации	• Увеличьте относительную влажность в процессе подготовки образцов на стеклах • Увеличьте температуру водяной бани в процессе подготовки образцов на стеклах • Увеличьте время сушки образцов на стеклах • Выдерживайте стекла не менее суток при комнатной температуре перед проведением денатурации • Нагрейте стекла перед денатурацией до 45°C в течение 10-15 мин. • Проверьте температуру водяной бани
• Слишком яркий сигнал	• Концентрация зонда слишком высокая для вашего микроскопа	• Попытайте блокировать некоторые сигналы путем помещения фильтра с нейтральной плотностью на пути возбуждающего луча

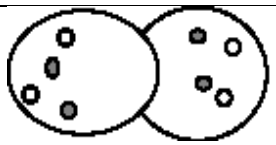
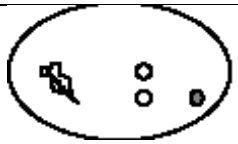
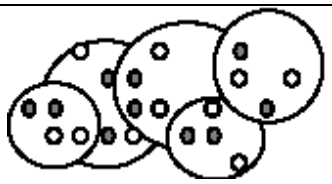
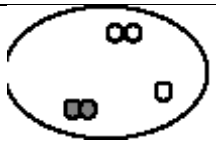
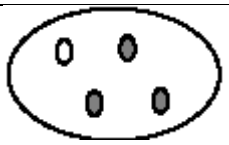
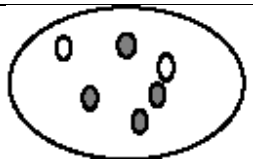
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1

Руководство к оценке количества сигналов двух цветов

Зеленый зонд

Оранжевый зонд

1		Не подсчитывается. Ядра накладываются друг на друга, области обоих ядер не видны.
2		Считается как два оранжевых сигнала и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал расплывчатый.
3		Не подсчитывается. Ядра накладываются друг на друга, границы ядер не видны полностью.
4		Считается как два оранжевых и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал раздвоенный.
5		Считается как один оранжевый сигнал и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал раздвоенный, один оранжевый сигнал раздвоенный.
6		Считается как два оранжевых сигнала и один зеленый сигнал
7		Считается как три оранжевых сигнала и один зеленый сигнал.
8		Считается как четыре оранжевых сигнала и два зеленых сигнала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроль качества

Использование контрольных стекол

Параллельно со стеклами с образцами пациентов должны анализироваться контрольные стекла с низким мужским уровнем (5% XY/95% XX) и низким женским уровнем (5% XX/95% XY) для мониторинга анализа и точности подсчета сигналов. Контроли следует анализировать каждый день FISH тестирования и с каждой новой партией набора реагентов. Рекомендуется использовать Vysis Probe Chek стекла.

Оценка приемлемости качества препарата и подсчета количества сигналов в подготовленных стеклах проводятся в соответствии с критериями, описанными выше в разделе «Подсчет сигналов». Качество анализа считается приемлемым, если приготовленные контрольные стекла удовлетворяют критериям приемлемости, а результаты подсчета сигналов находятся внутри диапазона значений, указанного на инструкции, прилагаемой к контрольным стеклам.

Если качество контрольных стекол удовлетворяет критериям приемлемости, однако результаты подсчета сигналов выходят за указанные пределы, наиболее вероятным является неправильное проведение подсчета, следует провести независимый повторный анализ того же препарата. См. таблицу 1 (Возможные проблемы и их устранение) для определения возможных причин и проведения действий для разрешения проблемы.

Если контрольные стекла соответствуют критериям приемлемости, но значения, полученные при подсчете сигналов, выходят за указанный диапазон, то по-видимому подсчет проводился некорректно и не независимо, необходимо повторить оценку того же стекла.

Ни в коем случае нельзя сообщать результаты FISH, если значения контролей не удовлетворительны. При анализе клинических образцов, для которых затруднена интерпретация гибридизационных сигналов, и недостаточно образца для проведения повторного теста, тест признается неинформативным.

***Примечание*: В упаковке Vysis ProbeChek содержится пять стекол с низким мужским контролем (кат. № 30-805012) или пять стекол с низким женским контролем (кат. № 30-805011). Приемлемый диапазон для ядер %XY/XX указан на вкладышах, вложенных в упаковку вместе со стеклами.**

Интерпретация результатов

Результаты подсчета в 500 интерфазных ядрах сообщаются в виде количественного значения и процентов интерфазных ядер с сигналами XX, XY и «другими» сигналами. Под «другими сигналами» подразумеваются сигналы XXY, XYY, XXX, XXXX, XXYY, X и Y; основными интересующими показателями являются % клеток с сигналами XX и XY. Несмотря на то, что при стандартном цитогенетическом исследовании и FISH анализе с зондами CEP X/Y в образцах костного мозга, взятых до трансплантации, обнаруживаются «другие» сигналы либо донора, либо реципиента, суммарный процент клеток с сигналами XX и XY должен превышать 95%. Образцы реципиентов костного мозга от донора противоположного пола, содержащие >0,6% донорских клеток, расцениваются как положительные на наличие донорских клеток. Образцы, содержащие ≤0,6% донорских клеток, расцениваются как отрицательные, хотя при этом наличие донорских клеток все-таки не исключено. Когда процент интерфазных ядер с сигналами XX или XY находится вблизи порогового значения (<5%), результаты необходимо интерпретировать с осторожностью.

Результаты подсчета в 20-30 метафазных клетках сообщаются в виде количественного значения и процента содержания метафазных клеток с сигналами XX и XY. Интерпретация результатов проводится в соответствии с правилами стандартного цитогенетического исследования. По этим правилам образец расценивается как отрицательный на наличие донорских клеток при отсутствии метафаз донорского происхождения в 20-30 метафазных пластинках. Если обнаруживается одна или более метафазная пластинка донорского происхождения, образец расценивается как положительный на наличие донорских клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Соотношение количества клеток с сигналами XX и XY может использоваться для оценки успешности приживления трансплантатов костного мозга доноров противоположного пола. В отношении метафазного анализа не показано клинической значимости выявления только одной клетки реципиента. С помощью FISH в интерфазных клетках возможно выявление даже 1% клеток реципиента (или донора), однако клиническая значимость выявления 1% по сравнению с 5% клеток реципиента неизвестна. Несмотря на то, что достоверные изменения в пропорции клеток реципиента/донора могут иметь клиническую значимость, эта методика не предназначена для мониторинга успешности приживления трансплантата.

Если результаты стандартного цитогенетического исследования и FISH не совпадают или их результаты не согласуются с клинической картиной, причины этих несоответствий должны быть тщательно исследованы. При несоответствии результатов исследований можно предположить ошибки в результатах одной или обеих методик, различия в аналитической чувствительности/специфичности методик, истинные различия по хромосомам X/Y между клеточными популяциями, обнаруженные с помощью различных методик (например, между делящимися метафазными клетками и неделящимися интерфазными клетками), возможны другие объяснения. Если процентное соотношение интерфазных ядер с сигналами XX и XY оказывается близким к пороговому значению (<5%), результаты следует интерпретировать с осторожностью, может потребоваться повторный анализ. Для анализа возможности получения неверных результатов можно использовать повторную FISH (одновременно с образцами для контроля качества) и/или повторное стандартное цитогенетическое исследование этого образца. Если причины любого несоответствия в результатах анализов остаются невыясненными или результаты анализа не согласуются с клинической картиной, целесообразно провести консилиум цитогенетика и лечащего врача.

Ограничения

1. Набор ДНК-зондов CEP X/Y предназначен только для хромосом в интерфазных ядрах или метафазных пластинках из образцов костного мозга.
2. Набор позволяет идентифицировать только соотношение количества клеток донора и реципиента в образцах костного мозга после трансплантации костного мозга от донора противоположного пола. При этом подразделение на нормальные и опухолевые клетки невозможно; набор не предназначен для идентификации структурных и других хромосомных аномалий в опухолевых клонах клеток, для этого используется стандартное цитогенетическое исследование.
3. У пожилых мужчин иногда в клетках костного мозга Y-хромосома может отсутствовать, независимо от того, принадлежит ли этот образец донору, реципиенту или пациенту с трансплантатом костного мозга в послеоперационном периоде[8].
4. Очень важно перед процедурой трансплантации провести цитогенетическое исследование как у донора, так и у реципиента по следующим причинам: (1) В редких случаях у мужчин встречаются варианты строения Y-хромосомы (отсутствие гетерохроматинового участка Yq), в результате чего ее невозможно идентифицировать с помощью анализа с CEP X/Y. (2) У некоторых индивидов в других хромосомах могут присутствовать объектные ДНК-последовательности, гибридизирующиеся с зондами CEP X или Y. Для CEP X такие случаи не изучены, частота же полиморфных хромосомных вариантов, гибридизирующихся с зондом к Y-хромосоме, составляет 1 на 2000[9]. Такие варианты могут быть обнаружены при метафазном анализе CEP X/Y и, иногда, при стандартном цитогенетическом исследовании. (3) У донора или реципиента может иметь место конституциональная анеуплоидия по половым хромосомам, в том числе мозаицизм, которая затрудняет подсчет сигналов и интерпретацию результатов.
5. У доноров или реципиентов мужского пола с кариотипом 46,XY,-Y,+X с помощью CEP X/Y будет обнаруживаться некоторое количество клеток с сигналами XX.
6. Образец костного мозга может быть контаминирован и разведен периферической кровью. Важно распознать потенциальное влияние этого эффекта разведения на результаты FISH-анализа; разведение образца может приводить к изменению соотношения количества клеток донора и реципиента.
7. Набор CEP X/Y предназначен только для анализа в культуре нестимулированных клеток костного мозга, полученной от реципиентов трансплантатов костного мозга (ТКМ) от донора

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

противоположного пола. Набор не используется для определения количества X- и Y-хромосом у индивидов других групп, а также в любом другом материале (амниоциты, ворсины хориона, фибробласты, опухолевые клетки, длительно культивированные клетки).
8. Если качество препарата и/или его приготовления неудовлетворительно, результаты FISH могут быть неинформативными.
9. Данный набор не предназначен для анализа образцов пациентов с трансплантатами костного мозга от донора того же пола или для диагностики или скрининга конституциональных хромосомных анеуплоидий X и Y.
10. Как среди клеток донора, так и среди клеток реципиента могут персистировать остаточные плодные клетки, однако их уровень, скорее всего, будет ниже предела чувствительности как стандартного цитогенетического исследования, так и FISH.
11. Анализ CEP X/Y не предназначен для мониторинга приживления трансплантата.
12. Оценка клинической значимости и интерпретация результатов FISH должны осуществляться с учетом результатов анализа соответствующих контролей, стандартного цитогенетического исследования, а также с учетом анамнеза пациента и других особенностей клинической картины.

Ожидаемые значения

Для определения ожидаемого соотношения количества клеток с сигналами XY и XX и порогового значения для выявления наличия или отсутствия клеток с сигналом XX у мужчин и клеток с сигналом XY у женщин, проводили подсчет сигналов интерфазной FISH в образцах костного мозга здоровых индивидов и пациентов с трансплантами костного мозга от донора противоположного пола. В каждом образце подсчитывали проценты клеток с сигналом XX, XY и «другими» сигналами (например, X0, XXY, XXYY и другие).

Результаты анализа образцов здоровых индивидов

Интерфазный FISH-анализ провели в образцах костного мозга 57 здоровых женщин и 71 здорового мужчины. Полученное в этой популяции распределение сигналов суммировано в таблицах 4 и 5.

Таблица 4
Распределение процентов клеток с сигналами X и Y в образцах костного мозга 71 здорового мужчины

	Процент клеток с:								
	XX	XY	X0	XXX	0Y	XXY	XYY	XXYY	XXXX
Среднее	0,04	98,51	1,03	0,00	0,21	0,10	0,02	0,06	0,00
SD	0,10	1,86	1,38	0,00	0,40	0,17	0,06	0,12	0,00

Таблица 5
Распределение процентов клеток с сигналами X и Y в образцах костного мозга 57 здоровых женщин

	Процент клеток с:								
	XX	XY	X0	XXX	0Y	XXY	XYY	XXYY	XXXX
Среднее	97,38	0,01	2,33	0,14	0,004	0,00	0,00	0,00	0,07
SD	1,81	0,05	1,66	0,20	0,026	0,00	0,00	0,00	0,17

Для определения ожидаемых значений в образцах костного мозга с нормальным кариотипом использовали два оценочных показателя: процент клеток с сигналом XY у мужчин и XX у женщин и процент клеток с сигналом XX у мужчин и XY у женщин. Средний (±S.D.) процент клеток с сигналами XY и XX у мужчин в норме составил 98,51% (±1,86%) и 0,04% (±0,10%) соответственно. Средний (±S.D.) процент клеток с сигналами XX и XY у женщин в норме составил 97,38% (±1,81%) и 0,01% (±0,05%) соответственно. Таким образом, при использовании рекомендуемых правил подсчета в практической деятельности процент клеток с сигналами XY в образцах костного мозга у мужчин в норме должен составлять от 94,9% до 100% (95%-ный ДИ), процент клеток с сигналами XX у женщин в норме — от 93,8% до 100% (95%-ный ДИ); процент клеток с сигналами XX у

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

мужчин в норме — от 0% до 0,24% (95%-ный ДИ), процент клеток с сигналами XY у женщин в норме — от 0% до 0,20% (95%-ный ДИ).

Результаты анализа образцов пациентов с трансплантатами костного мозга от донора противоположного пола

Распределение сигналов интерфазной FISH анализировали в образцах 143 пациентов с трансплантатами костного мозга от донора противоположного пола. Полученное в этой популяции (71 женщина и 72 мужчины) распределение сигналов суммировано в таблицах 6 и 7.

Таблица 6

Распределение процентов клеток с сигналами X и Y в образцах костного мозга 71 женщины-реципиентки трансплантата костного мозга от донора противоположного пола

	Процент клеток с:								
	XX	XY	X0	XXX	0Y	XXY	XYY	XXYY	XXXX
Среднее	5,88	92,99	0,008	0,025	0,14	0,001	0,011	0,073	0,014
SD	19,3	19,35	0,010	0,112	0,29	0,002	0,046	0,214	0,098

Таблица 7

Распределение процентов клеток с сигналами X и Y в образцах костного мозга 72 мужчин-реципиентов трансплантата костного мозга от донора противоположного пола

	Процент клеток с:								
	XX	XY	X0	XXX	0Y	XXY	XYY	XXYY	XXXX
Среднее	92,72	5,64	0,015	0,067	0,011	0,0002	0,006	0,003	0,067
SD	16,91	16,8	0,013	0,157	0,094	0,0011	0,033	0,024	0,174

Для определения ожидаемых значений в образцах пациентов с трансплантатами костного мозга от донора противоположного пола использовали следующий оценочный показатель — процент клеток с сигналами XX у мужчин и XY у женщин. На материале FISH в образцах 71 женщины средний (±S.D.) процент клеток с сигналами XY составил 95,69% (±11,35%) с диапазоном от 29,4% до 100%. На материале FISH в образцах 72 мужчин средний (±S.D.) процент клеток с сигналами XX составил 92,72% (±16,91%) с диапазоном от 10,4% до 100%.

Определение порогового значения для оценки наличия клеток донора противоположного пола

Другой оценочной категорией в образцах костного мозга здоровых индивидов был процент клеток с сигналами XX у мужчин и сигналами XY у женщин в норме. На основе значений этих процентов вычисляли пороговое значение для определения наличия или отсутствия клеток костного мозга с хромосомным набором противоположного пола. В базисном исследовании на материале 128 образцов (57 женщин и 71 мужчина) определяли процент клеток с сигналами XX у мужчин и сигналами XY у женщин. Нормальный диапазон значений определяли путем расчета одностороннего 95%-ного доверительного интервала на основе биноминального распределения пропорции интерфазных клеток с сигналами XX или XY; верхняя граница составила 0,6%. Для определения порогового значения с помощью методики расчета доверительных пределов для пропорций[10] была составлена следующая таблица (таблица 8).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 8
Пороговое значение для оценки наличия донорских клеток, определенное на основе количества клеток с сигналами XX у мужчин в норме и клеток с сигналами XY у женщин в норме

Обнаруженное количество клеток с хромосомным набором противоположного пола	500 клеток
0	0,6%
1	1,0%
2	1,25
3	1,6%
4	1,8%
5	2,1%

Основываясь на вышеуказанных данных, пороговое значение для оценки наличия донорских клеток у пациентов с трансплантатами костного мозга от донора противоположного пола составило 0,6%. Перед использованием набора зондов CEP X/Y в клинической практике каждая лаборатория должна верифицировать пороговое значение путем анализа и подсчета сигналов в образцах костного мозга как минимум 10 мужчин и 10 женщин в соответствии с инструкциями по подсчету из прилагаемой инструкции. Процент клеток с сигналами XX в образцах здоровых мужчин и процент клеток с сигналами XY в образцах здоровых женщин должны быть ниже порогового значения (0,6%). Если данное пороговое значение не соответствует полученному в лаборатории, пользователи могут установить пороговое значение самостоятельно в соответствии со статистической процедурой, описанной выше. Обратите внимание, что размер выборки из 20 человек (10 мужчин и 10 женщин) недостаточен для определения нового порогового значения.

Характеристики анализа

Аналитическая чувствительность и специфичность

Эффективность гибридизации

В базисном исследовании на материале 143 образцов костного мозга средний процент клеток с единственным гибридизационным сигналом составил 0,012% (S.D.=0,15%). Таким образом, практическим стандартом приемлемости можно считать присутствие <2% клеток с единственным сигналом.

Аналитическая чувствительность

Аналитическую чувствительность зондов из набора CEP X/Y определяли путем исследования воспроизводимости, описанного ниже. В этом исследовании в 0% XY-образцов было определено среднее количество (±S.D.), составившее 0,00% (±0,00%) XY-ядер, в 1% XY-образцов — 0,94% (±0,32%). В этом исследовании в 0% XX-образцов было определено среднее количество (±S.D.) 0,00% (±0,00%) XX-ядер, в 1% XX-образцов — 0,95% (±0,34%). Существовал небольшой перекрест между 0%-ными и 1%-ными образцами; нижний предел 95%-ного доверительного интервала для 1%-ных образцов составил 0,31% и 0,28% для XY- и XX-ядер соответственно. Таким образом, пределом обнаружения для набора CEP X/Y можно считать 1,0%.

Аналитическая специфичность

Исследования локусной специфичности проводили с использованием стандартных протоколов Vysis QC в метафазных клетках. В 65 метафазных клетках проводили G-окраску для идентификации хромосом X и Y, а затем FISH. Ни в одной из 65 клеток перекрестной гибридизации с другими хромосомными локусами не выявили; оба зонда гибридизировались только со специфичными локусами: центромерным сегментом X-хромосомы и сегментом Yq12 Y-хромосомы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости интерфазного анализа CEP X/Y анализировали полученный процент клеток с сигналами XX и XY в образцах костного мозга с соотношением XY/XX, равным 0%/100%, 1%/99%, 5%/95%, 95%/5%, 99%/1% и 100%/0%. В базисном исследовании оценивали воспроизводимость (между лабораториями, между наборами реагентов, между днями и между специалистами) результатов анализа образцов клеток костного мозга двух типов из перечисленных (с соотношением XY/XX, равным приблизительно 99%/1% и 100%/0%), а также двух типов образцов клеток крови человека с соотношением XY/XX, равным приблизительно 0%/100% и 1%/99%. Процент клеток с сигналами XX и XY оценивали в соответствии с прилагаемыми инструкциями по подсчету сигналов. С помощью метода ANOVA обнаружили статистически достоверные вариации между лабораториями и между специалистами, которые отражают субъективность в визуальном подсчете сигналов. В дополнение к перечисленным выше образцам, в одной из лабораторий были приготовлены и проанализированы 4 образца костного мозга с соотношениями XY/XX, равными приблизительно 0%/100%, 1%/99%, 5%/95% и 95%/5%. В **Таблицах 9-13** приведены данные по средним значениям, стандартным отклонениям и процентным коэффициентам вариации для полученных значений процентов клеток с сигналами XX и XY в образцах, включенных в базисное исследование, и в дополнительных образцах костного мозга.

Таблица 9
Воспроизводимость для полученного % ядер с сигналами XY/XX

Уровень образцов с XY/XX		n	Среднее значение (%)		Стандартное отклонение (%)		Коэффициент вариации (%)	
			XY	XX	XY	XX	XY	XX
0%	100%	10	0,00	97,4	0,00	1,18	—	1,21
1%	99%	20	0,88	97,2	0,48	2,00	54,8	2,06
5%	95%	20	4,90	94,9	0,99	0,99	20,2	1,04
95%	5%	10	95,0	4,96	1,60	1,60	1,68	32,3
99%	1%	24	98,3	0,95	0,41	0,34	0,41	36,3
100%	0%	24	99,0	0,00	0,47	0,00	0,48	—

Таблица 10
Суммарные статистические данные для полученного % ядер с сигналами XY/XX по воспроизводимости между лабораториями

Уровень		Статистические показатели	Лаборатория 1		Лаборатория 2		Лаборатория 3	
XX	XY		XX	XY	XX	XY	XX	XY
100%	0%	Среднее S.D. C.V. (%) n=10	97,40 1,18 1,21	0,00 0,00 —				
99%	1%	Среднее S.D. C.V. (%) n=20	97,20 2,00 2,06	0,88 0,48 54,8				

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

95%	5%	Среднее S.D. C.V. (%) n=20	94,9 0,99 1,04	4,90 0,99 20,2				
5%	95%	Среднее S.D. C.V. (%) n=10	4,96 1,60 32,3	95,0 1,60 1,68				
1%	99%	Среднее S.D. C.V. (%) n=8	0,90 0,36 39,40	97,80 0,84 0,86	0,88 0,21 24,24	98,90 0,21 0,22	0,65 0,30 45,79	99,23 0,29 0,29
0%	100%	Среднее S.D. C.V. (%) n=8	0,00 0,00 —	98,93 0,48 0,48	0,00 0,00 —	99,75 0,28 0,28	0,00 0,00 —	99,73 0,18 0,18

S.D. – стандартное отклонение, C.V. (%) – коэффициент вариации

Таблица 11
Суммарные статистические данные для полученного % ядер с сигналами XY/XX по воспроизводимости между партиями наборов зондов

Уровень		Статистические показатели	Партия 1		Партия 2		Партия 3		Партия 4	
XX	XY		XX	XY	XX	XY	XX	XY	XX	XY
100%	0%	Среднее S.D. C.V. (%) n=10	97,40 1,18 1,21	0,00 0,00 —						
99%	1%	Среднее S.D. C.V. (%) n=20	97,20 2,00 2,06	0,88 0,48 54,8						
95%	5%	Среднее S.D. C.V. (%) n=20	94,9 0,99 1,04	4,90 0,99 20,2						

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5%	95%	Среднее S.D. C.V. (%) n=10	4,96 1,60 32,3	95,0 1,60 1,68						
1%	99%	Среднее S.D. C.V. (%) n=6	0,83 0,20 23,60	98,70 0,69 0,70	0,87 0,21 24,14	98,60 0,77 0,78	0,60 0,36 59,63	98,87 0,80 0,81	0,93 0,37 39,90	98,40 1,06 1,08
0%	100%	Среднее S.D. C.V. (%) n=6	0,00 0,00 —	99,50 0,52 0,52	0,00 0,00 —	99,43 0,57 0,58	0,00 0,00 —	99,43 0,63 0,63	0,00 0,00 —	99,50 0,44

S.D. – стандартное отклонение, C.V. (%) – коэффициент вариации

Таблица 12

Суммарные статистические данные для полученного % ядер с сигналами XY/XX по воспроизводимости между днями

Уровень		Статистические показатели	День 1		День 2		День 3		День 4	
XX	XY		XX	XY	XX	XY	XX	XY	XX	XY
100%	0%	Среднее S.D. C.V. (%) n=10	97,40 1,18 1,21	0,00 0,00 —						
99%	1%	Среднее S.D. C.V. (%) n=20	97,20 2,00 2,06	0,88 0,48 54,8						
95%	5%	Среднее S.D. C.V. (%) n=20	94,9 0,99 1,04	4,90 0,99 20,2						
5%	95%	Среднее S.D. C.V. (%) n=10	4,96 1,60 32,3	95,0 1,60 1,68						

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1%	99%	Среднее	0,83	98,70	0,93	98,40	0,77	98,63	0,70	98,83
		S.D.	0,20	0,69	0,37	1,06	0,15	0,77	0,43	0,80
		C.V. (%)	23,60	0,70	39,90	1,08	19,64	0,79	61,94	0,81
		n=6								
0%	100%	Среднее	0,00	99,50	0,00	99,43	0,00	99,40	0,00	99,53
		S.D.	0,00	0,56	0,00	0,63	0,00	0,51	0,00	0,45
		C.V. (%)	—	0,57	—	0,63	—	0,51	—	0,45
		n=6								

Таблица 13
Суммарные статистические данные по полученному % ядер XY/XX по воспроизводимости между результатами, полученными разными специалистами

Уровень		Статистические показатели	Специалист 1		Специалист 2	
XX	XY		XX	XY	XX	XY
100%	0%	Среднее	98,00	0,00	96,80	0,00
		S.D.	0,71	0,00	1,31	0,00
		C.V. (%)	0,73	—	1,35	—
		n=5				
99%	1%	Среднее	95,4	0,80	99,00	0,96
		S.D.	0,93	0,53	0,45	0,48
		C.V. (%)	0,97	66,1	0,45	50,0
		n=10				
95%	5%	Среднее	95,2	4,48	94,56	5,32
		S.D.	0,65	0,53	1,19	1,18
		C.V. (%)	0,68	11,8	1,26	22,2
		n=10				
5%	95%	Среднее	5,16	94,84	4,76	95,20
		S.D.	2,36	2,36	0,61	0,61
		C.V. (%)	45,73	2,49	12,8	0,64
		n=5				
1%	99%	Среднее	0,80	98,50	0,82	98,78
		S.D.	0,33	1,04	0,29	0,46
		C.V. (%)	41,29	1,06	35,35	0,47
		n=12				

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0%	100%	Среднее S.D. C.V. (%) n=12	0,00 0,00 —	99,45 0,65 0,65	0,07 0,23 —	99,58 0,42 —

S.D. – стандартное отклонение, C.V. (%) – коэффициент вариации

Корреляция с другими методиками: клинические данные

Для оценки характеристик набора ДНК-зондов CEP X/Y, по сравнению со стандартным цитогенетическим анализом, в определении соотношения количества клеток с сигналами XX и XY было проведено многоцентровое слепое контролируемое сравнительное исследование на реципиентах трансплантатов костного мозга (ТКМ) от донора противоположного пола. Из архива образцов костного мозга, проанализированных ранее по стандартной цитогенетической методике, были отобраны образцы 143 пациентов (72 мужчины и 71 женщина), являющихся реципиентами ТКМ от донора противоположного пола. Образцы анализировали в трех лабораториях: 40 образцов в лаборатории 1, 52 — в лаборатории 2 и 51 — в лаборатории 3. Эти образцы были взяты у пациентов с одним из следующих диагнозов:

1. Хронический миелолейкоз (ХМЛ): 69 образцов
2. Острый миелолейкоз (ОМЛ) или острый нелимфоидный лейкоз (ОНЛЛ): 30 образцов
3. Миелодиспластический синдром (МДС): 7 образцов
4. Острый лимфолейкоз (ОЛЛ): 21 образец
5. Неклассифицируемое гематологическое расстройство (НКГР), при котором требуется цитогенетический анализ: 16 образцов

Как для стандартного цитогенетического анализа, так и для FISH, все лаборатории использовали нестимулированные культивированные образцы. Стандартный цитогенетический анализ каждая лаборатория проводила по своему собственному протоколу, FISH-анализ проводился в соответствии с инструкциями к набору ДНК-зондов CEP X/Y. С помощью FISH количество клеток донора и реципиента подсчитывалось среди как минимум 20 метафазных и 500 интерфазных клеток.

Как и ожидалось, при стандартном цитогенетическом анализе донорские клетки обнаружились во всех 143 образцах пациентов с ТКМ от донора противоположного пола. В интерфазной FISH 143 образца из 143 были расценены как положительные на наличие донорских клеток (100% относительная чувствительность). В метафазной FISH 141 образец из 141[#] был расценен как положительный на наличие донорских клеток (100% относительная чувствительность). Распределение донорских клеток в зависимости от лаборатории и методики анализа показано в Таблице 12.

Таблица 14

Распределение донорских клеток в зависимости от лаборатории для каждой методики анализа

Методика	Распределение донорских клеток		
	Лаборатория 1	Лаборатория 2	Лаборатория 3
Стандартный цитогенетический анализ	От 2,5% до 100%	От 10,0% до 100%	От 30,0% до 100%
Метафазная FISH	От 3,2% до 100%	От 30,0% до 100%	От 25% до 100%
Интерфазная FISH	От 10,4% до 98,8%	От 29,4% до 100%	От 21,3% до 100%

Кроме оценки характеристик FISH в популяции пациентов с ТКМ от донора противоположного пола, на образцах 153 пациентов с ТКМ от донора того же пола оценивали возможности интерфазной и метафазной FISH в правильном определении как отрицательных образцов пациентов с ТКМ от донора того же пола. Распределение этих пациентов по диагнозам было сходным с таковым для пациентов с ТКМ от донора противоположного пола. В интерфазной FISH 149

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

образцов из 153 (97,4%) были правильно расценены как отрицательные. Все четыре ложно положительных случая относились к мужчинам-реципиентам ТКМ от донора того же пола. В одном случае кариотип мужчины был 46,XY,-Y,+X, в результате чего при FISH в 37,4% клеток отмечался сигнал XX. В остальных трех случаях уровень клеток с сигналами XX был низким (4,6%, 1,6% и 0,8%). В метафазной FISH 151 образец из 153 (98,7%) был расценен как отрицательный. Оба ложно положительных случая относились к пациентам с противоречивым результатом интерфазной FISH. В одном случае кариотип мужчины был 46,XY,-Y,+X, в результате чего при FISH в 20% клеток отмечался сигнал XX. В другом случае при FISH сигнал XX был обнаружен в 7,1% клеток.

Ошибки в интерпретации результатов обследования реципиентов ТКМ от донора того же пола с приобретенным аномальным кариотипом демонстрируют важность проведения цитогенетического анализа в сочетании с FISH перед трансплантацией. В других 3 ложно положительных случаях уровень клеток с сигналом XX при FISH был низким; кариотип клеток как донора, так и реципиента был 46,XY. Хотя при FISH не отмечалось неправильно интерпретированных образцов женщин с ТКМ от донора того же пола, при наличии низких уровней клеток донора/реципиента результаты следует интерпретировать с осторожностью. Все результаты FISH необходимо интерпретировать, сопоставляя их с результатами стандартного цитогенетического исследования и с учетом клинических данных.

В двух образцах не было метафазных пластинок, приемлемых для FISH, поэтому общее число образцов составило 141 вместо 143.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Haas OA, Hinterberger W, Schmidmeier W, et al. Cytogenetic studies in bone marrow transplant recipients. *Blut.* 1986;53:29-38.
2. Walker H, Singer CRJ, Patterson J, et al. The significance of host haemopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br J Haematol.* 1986;62:385-391.
3. Lawler SD, Baker MC, Harris H, et al. Cytogenetic studies on recipients of allogenetic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol.* 1984;56:431-443.
4. Schattenberg A, DeWitte T, Salden M, et al. Mixed hematopoietic chimerism after transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood.* 1989;73:1367-72.
5. Hook E. Exclusion of chromosomal mosaicism: Tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. *American Journal of Human Genetics.* 1977;29:94-97.
6. U.S. Centers for Disease Control. *Morbidity and Mortality Weekly Review*. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.
7. Barch MJ, ed. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual.* 3rd ed. New York, NY: Raven Press, Ltd;1997.
8. Przepiorka D, Thomas ED, Durnam DM, et al. Use of a probe to repeat sequence of the Y chromosome for detection of host cells in peripheral blood of bone marrow transplant recipients. *Am J Clin Pathol.* 1991;95:201-206.
9. Alitalo T, Tihonen J, Hakola P, et al. Molecular characterization of a Y;15 translocation segregating in a family. *Hum Genet.* 1988;79:29-35.
10. Beyer WH. *CRC Handbook of Tables for Probability and Statistics*, Second Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA, 1968:219.
11. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009. [Also available online. *Type* > www.cdc.gov, *search* > BMBL5 > *look up* sections III and IV].
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.
15. Erlecke J, Hartmann I, Hoffmann M, et al. Automated detection of residual cells after sex-mismatched stem-cell transplantation - evidence for presence of disease-marker negative residual cells. *Mol Cytogenet*. 2009;2:12.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

16. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(9):473-485.

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.
CEP и Vysis являются зарегистрированными торговыми марками Vysis Inc. SpectrunOrange и ProbeChek это торговые марки Vysis Inc.

Патенты США #5, 447, 841 лицензированы исключительно Vysis Калифорнийским университетом, захватывают ДНК-зонды, включающие блокирующую ДНК и уникальные сиквенсовые последовательности, такие как Vysis LIS зонды.
Пробы Vysis LSI, CEP, и WCP, меченые флуорохромами, защищены американскими патентами #5, 491, 224.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2006, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Апрель 2020
30-608310/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

en

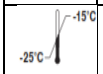
REF 08L60-020

30-608208/R3

Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color,
Dual Fusion Translocation Probe Set
REF 08L60-020
30-608208/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная проба флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) предназначена для определения t(14;18)(q32;q21) который располагается рядом с IGH (тяжелые цепи иммуноглобулинов) локусов и геном BCL2 (B-клеточный лейкоз/лимфома).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ТЕСТИРОВАНИЕ

t(14;18)(q32;q21) - IGH/BCL2 встречается у 70% - 90% больных фолликулярной лимфомой (FL).[1,2] Он также обнаруживается в 20 - 30% случаев диффузной крупноклеточной B-лимфомы.[3,4] К тому же, транслокация наблюдается при некоторых других лейкозах.[5,6]

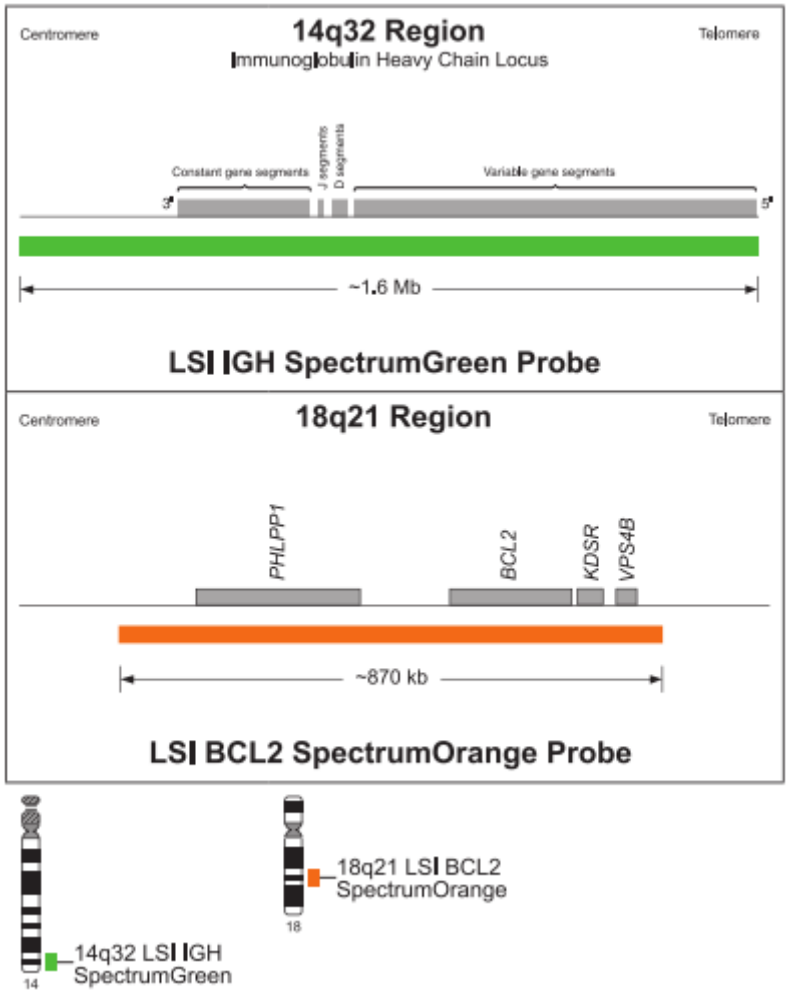
Данная транслокация гена BCL2 находится под контролем стимулятора транскрипции иммуноглобулинов (IgH Eμ) который понижает экспрессию гена BCL2 и тем самым вызывает повышенную продукцию белка bcl-2, блокирующего апоптоз.

Einerson и коллеги (2005) использовал пробу Vysis LSI IGH/BCL2 в сравнении FISH и ПЦР для определения t(14;18)(q32;q21) в залитых парафином фиксированных тканевых образцах фолликулярной лимфомы. Из фиксированных тканей выделялись ядра для FISH, и в результате FISH показала свое превосходство по сравнению с ПЦР в определении t(14;18)(q32;q21) - IGH/BCL2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Набор двухцветных проб двойного слияния транслокации Vysis LSI IGH/BCL2 является смесью пробы SpectrumGreen LSI IGH и пробы SpectrumOrange BCL2. Проба LSI IGH захватывает примерно 1,5 м.н. цели и содержит последовательности, охватывающие целый локус IGH, также же, как и последовательности, протягивающиеся на 300 т.н. вне 3' конца локуса IGH. Проба LSI BCL2 охватывает примерно 750 т.н. последовательности, содержит целый ген BCL2, и протягивается на 250 т.н. за пределы обоих концов гена.

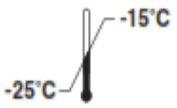


РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI Набор двухцветных проб двойного слияния транслокации IGH/BCL2 (Серийный номер. 30-191018) (1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 975 нг/мкл. Флуорофор-маркированная проба ДНК и блокирующий ДНК в трис-ЭДТА буфере.

2. Vysis LSI/WCP® Буфер гибридизации (Серийный номер. 30-804826) (1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ



Vysis LSI Набор двухцветных проб двойного слияния транслокации IGH/BCL2 должна храниться при -20°C (±5°C) в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Vysis LSI Набор двухцветных проб двойного слияния транслокации IGH/BCL2 проба транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color Dual Fusion Translocation Probe Set

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[11], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[12], CLSI документ M29-A3[13], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[14].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[11].

- Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света.
Разрушение: под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Сбор образцов и подготовка анализа
Патерностер (Paternoster), совместно с другими авторами (7), описал методику выделения клеточных ядер из залитых в парафин тканевых срезов больных лейкомой, в целях использования во флуоресцентной гибридизации (FISH).

Айнерсон (Einerson), совместно с другими, (8) использовал данную методику в пробах Vysis LSI IGH/BCL2 в своих сравнительных исследованиях PCR/FISH. Бэрранс (Barrans) и другие (9) описал альтернативный метод изоляции ядер из клеток фиксированных срезов для использования во флуоресцентной гибридизации (FISH), а также методику подготовки свежих или замороженных образцов тканей. Сообщается, что при проведении исследования проб Vysis LSI IGH/BCL2 были использованы обе этим методики.

Методика
Требуемые материалы
- Vysis LSI BCR/ABL ES, двухцветной пробы транслокации
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипеттор (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Приготовление целевого образца
ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.
1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погружайте не более, чем 4 препарата одновременно.
3. Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

Приготовление пробной смеси
1. Добавьте следующие ингредиенты для каждой целевой области, в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.
2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73±1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов. Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Методика быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2XSSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4XSSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.

- Налейте 70 мл 2XSSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло одного препарата и немедленно погрузите препарат в 0.4X SSC/0.3% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Повторите эту манипуляцию с каждым препаратом.
2. Удалите препараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температуре отмывочного раствора составляет 73±1°C до помывки других препаратов.

3. Погрузите препараты в 2XSSC/0.1% NP-40. Встряхивайте препараты в течение 1-3 секунд. Удалите препараты через 5 секунд - 1 минуту.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: Препараты, которые хранятся при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте могут быть проанализированы в течение, по крайней мере, 3 недель после гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения препаратов образцов с пробами и покровными стеклами, на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, препараты удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Опис

анные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
2 мкл очищенной H_2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H_2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite™. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite™ может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа-или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл красителя в целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Ограничения методики

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена с использованием соответствующих контрольных проб и аналитических методик [10] наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Ожидаемые результаты

В нормальном ядре, гибридизированном с помощью пробы Vysis LSI IGH/BCL2, ожидаемый рисунок состоит из 2 оранжевых и 2 зеленых сигналов (2O2G). В ядре, содержащем t(14;18) - IGH/BCL2, будут получены 1 оранжевый, 1 зеленый, и 2 оранжевых/зеленых (желтых) сигнала слияния, 2 хромосом (1O1G2F). Рисунки, отличные от 1O1G2F, могут наблюдаться в некоторых аномальных образцах, включая ядра с более чем 2 сигналами слияния. Интерпретация результатов FISH должна быть произведена путем утилизации соответствующих контрольных проб и аналитических техник [10] наряду с учетов других клинических и диагностических данных тестирования.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовка слайдов для коденатурации

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºС в течение 3 недель.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Rowely J. Chromosome studies in the Non-Hodgkin's Lymphomas: The Role of the 14;18 translocation. *J Clin Oncol* 1988;6:919-925. 2. Horsman D, Gascoyne R, Coupland R, et al. Comparison of Cytogenetic Analysis, Southern Analysis, and Polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma. *AM J Clin Pathol* 1995;103:472-478.
3. Jacobson J, Wilkes B, Kwiatkowski D, et al. bcl-2 rearrangements in De Novo diffuse large cell lymphoma. *Cancer* 1993;72:231-6.
4. Weiss L, Warnke R, Sklar J, et al. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987;317(19):1185-89.
5. Nowakowski GS, Dewald GW, Hoyer JD, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization with an IGH probe is importatant in the evaluation of patients with a clinical diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005;130:36-42.
6. Streubel B, Scheucher B, Valencak J, et al. Molecular cytogenetic evidence of t(14;18)(IGH;BCL2) in a substantial proportion of primary cutaneous follicle center lymphomas. *AM J Surg Pathol* 2006;20(4):529-36.
7. 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.
8. Einerson RR, Kurtin PJ, Dayharsh GA, et al. FISH is superior to PCR in detecting t(14;18)(q32;q21)-IgH/bcl-2 in follicular lymphoma using paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin* Pathol 2005;124:421-29.
9. Barrans SL, Evans P, O'Connor S, et al. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2003;5:168-75.
10. 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.
11. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color Dual Fusion Translocation Probe Set осуществляется на основании европейского патента № 5,663,319 и 5, 491, 224, приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента № RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 203, 977, приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumRed, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold, и HYBrite являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2006, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020
30-608208/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit

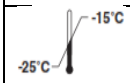
en

REF 01N69-020

30-608228/R3

Vysis IGH/FGFR3 DF
FISH Probe Kit
REF 01N69-020
30-608228/R3

Обозначения

	Законный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis IGH/FGFR3 DF FISH Probe предназначена для детекции рецепрокных транслокации t(4;14)(p16; q32), затрагивающих регионы генов FGFR3 и IGH.

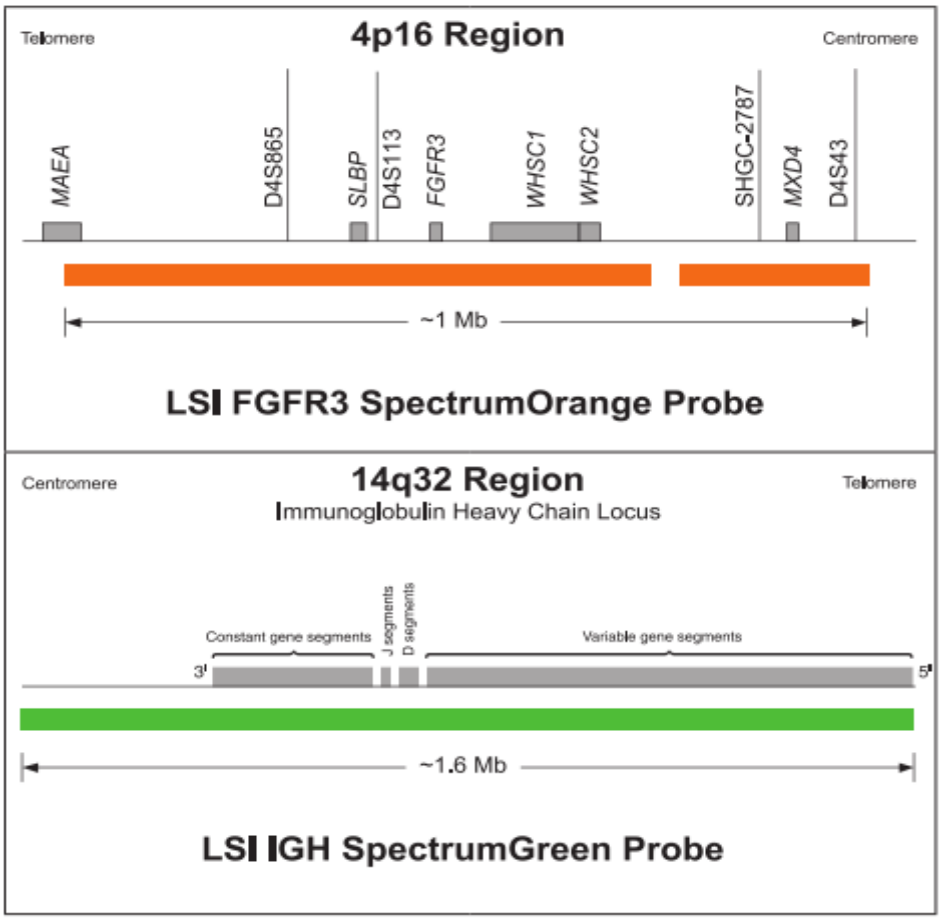
НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

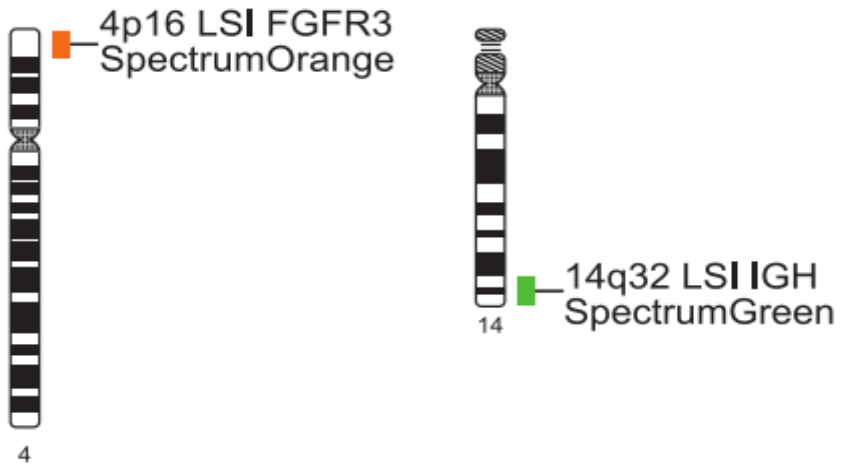
T(4;14)(p16; q32) распространенная транслокация при множественной миеломе (ММ), довольно часто не улавливается цитогенетическими методами из-за теломерного расположения на хромосоме в регионах, затрагивающих эту транслокацию. Исследования IFM99 демонстрируют, что t(4;14) отрицательно влияет на бессобытийную выживаемость и общую выживаемость у впервые диагностированных пациентов с множественной миеломой[1]. FISH-тестирование на транслокацию t(4;14)(p16; q32) показано как один из минимальных клинических тестов при постановке диагноза ММ и последующего лечения[2,3].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

Проба SpectrumOrange состоит из двух сегментов, размером приблизительно 1Mb (расположение UCSC, март 2006, chr4:1300606-2321488) с промежутком примерно в 39Kb (расположение UCSC, март 2006, chr4:2043467-2082355). Размером приблизительно 1.6Mb проба SpectrumGreen охватывает регион гена IGH. (расположение UCSC, март 2006, chr4:104736507-106339460).





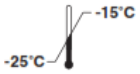
РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI IGH/FGFR3 DCDF проба (номер партии 30-191023) (1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 1000 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826)
(1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение



Зонд Vysis IGH/FGFR3 DF для FISH методики необходимо хранить при температуре -20ºC (±5°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis IGH/FGFR3 DF для FISH методики осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI IGH/FGFR3 DCDF проба

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[5]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P501 Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Методика
Необходимые материалы

- Зонды Vysis LSI IGH/FGFR3 DCDF
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Предполагаемые результаты

Ожидаемый сигнальный паттерн зонда Vysis LSI MYB SpectrumAqua (6q23) это два голубых сигнала. Другие сигнальные паттерны более чем с двумя голубыми сигналами, считаются атипичными сигнальными паттернами. Ожидаемый паттерн атипичной делеции зонда Vysis LSI MYB SpectrumAqua это один голубой сигнал. Могут встречаться другие атипичные паттерны сигналов и метафазный анализ может быть полезен в характеристике таких паттернов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4XSSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте время гибридизации. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2XSSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2XSSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2XSSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что значения pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многополосные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза) (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	непосредственно после денатурации зондов.	EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые температуру и временные промежутки в соответствии с методикой анализа из данной инструкции.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		покровного стекла при помощи герметика, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH–метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многопропускные фильтры дают меньше света, чем однопропускные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многопропускных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007;109(8):3489-95.
2. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia.* 2009;23(12):2210-21.
3. Anderson KC, Alsina M, Bensinger W, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: multiple myeloma. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009;7(9)908-42.
4. 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.
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). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
8. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI IGH/FGFR3 DF FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877 приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, 977, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abbott Laboratories
Март 2020
30-608228/R3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis Melanoma FISH Probe Kit

en

REF 01N89-020

30-608220/R7

Vysis Melanoma
FISH Probe Kit
REF 01N89-020
30-608220/R7

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Биологический риск
	Опасность
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

ДНК-зонд Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH Vysis Melanoma FISH Probe Kit (набор реактивов) предназначен для обнаружения числа копий генов RREB1 (6p25), MYB (6q23), CCND1(11q13) и центромерного участка 6-ой хромосомы *in situ* методом флуоресцентной гибридизации (FISH) образцов ткани кожи человека, фиксированных в формалине и обработанных парафином.

ДНК-зонд Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH Vysis Melanoma FISH Probe Kit (набор реактивов) должен использоваться как вспомогательное средство при диагностике меланомы в образцах ткани кожи человека.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И РАЗЪЯСНЕНИЯ

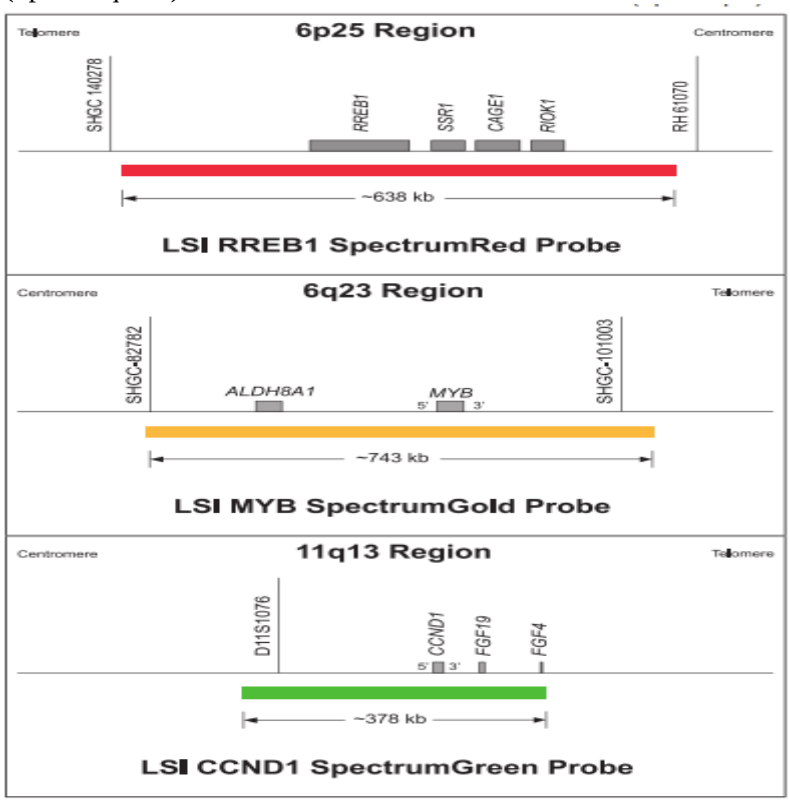
Во всем мире ежегодно фиксируется порядка 160.000 новых случаев возникновения злокачественной меланомы кожи. Заболеваемость меланомой возрастает на 4,1 процента в год, быстрее, чем любым другим злокачественным заболеванием. [1, 2] Данная патология является золотым стандартом для установления диагноза. Несмотря на то, что многие случаи могут быть надежно классифицированы в соответствии с современными патологическими критериями, существует значительное число случаев,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

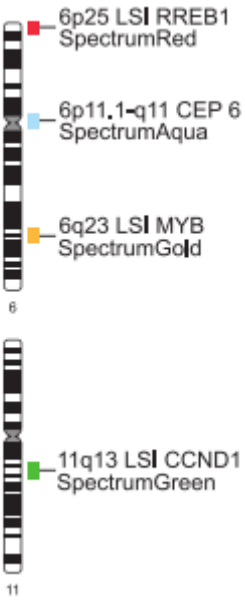
в которых консенсус не может быть достигнут даже среди специалистов высокого класса. Влияние этой неопределенности на стандартную клиническую практику было показано в недавнем исследовании, проведенном в Нидерландах. Группа экспертов рассмотрела 1069 консекутивных меланоцитарных поражений, которые были представлены на рассмотрение специалистам в области диагностики с целью выявления наиболее распространенных диагностических проблем. В итоге 22 случая из 158 (14%), которые первоначально были классифицированы как инвазивные меланомы, группа специалистов определила как доброкачественные поражения. И 85 случаев из 513 (16,6%), которые первоначально были классифицированы как доброкачественные поражения, группа специалистов определила как злокачественные.[3] Предыдущие исследования показали, что меланомы отличаются от родимых пятен (невусов) наличием многократно повторяющихся увеличенных участков хромосом или, наоборот, потерей части участков хромосом. Методом сравнительной геномной гибридизации (CGH) первичных меланом были обнаружены потери части участков хромосом 6q, 8p, 9p, и 10q и увеличение участков хромосом 1q, 6p. В хромосомах 7, 8q, 17q и 20q было обнаружено наибольшее количество копий ДНК, приводящих к образованию меланомы[4]. Выбор ДНК-зонда для Vysis Melanoma FISH Probe Kit был основан на оценке способности комбинаций зондов использовать многоцветную флуоресцентную гибридизацию in situ для обнаружения числа копий измененных хромосомных регионов, которые обычно оказываются отклонениями от нормы и приводят к меланомам. Флуоресцентная гибридизация in situ является методом, который позволяет визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот в рамках клеточной подготовки. В частности, FISH предполагает точный отжиг одноцепочечных меченых флуорофором ДНК-зондов с комплементарными целевыми последовательностями. Гибридизация зонда с ДНК-сайтом клетки является видимой при прямом обнаружении с помощью флуоресцентной микроскопии.

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

Зонд RREB1(6p25) помечен Spectrum Red и охватывает около 600 т.п.н. (kb) региона, который включает весь ген RREB1. Зонд MYB (6q23) помечен SpectrumGold и охватывает около 740 т.п.н. (kb) региона, который содержит весь ген MYB. Зонд CCND1 (11q13) помечен SpectrumGreen и охватывает около 378 т.п.н. (kb) региона, который содержит весь ген CCND1. Зонд CEP 6 помечен SpectrumAqua, гибридизируется с альфа-сателлитной ДНК, локализованной в центромерном участке хромосомы 6 (6p11.1-q11.1).



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

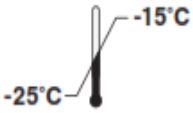


РЕАГЕНТЫ

1.Зонды Vysis LSI D7S522 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen (серия № 30-191038) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 225 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



ДНК-зонд Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH (набор реактивов) должен храниться при температуре -20ºC (±5°C) или ниже в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

ДНК-зонд Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH (набор реактивов) транспортируется на пакетах льда. Если вы получили реагенты, поврежденные или же находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD Предназначен только для диагностики *in vitro*.
Vysis LSI RREB1/LSI MYB/LSI CCND1/CEP 6 Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[8].

Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[9]

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид. Специальные обозначения некоторых препаратов: Внимание: только для профессиональных пользователей.

ДНК-зонд Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH (набор реактивов) предназначен только для использования на фиксированных формалином, а затем пропитанных парафином образцах ткани человеческой кожи. Все биологические образцы должны рассматриваться как потенциальный источник инфекционных агентов. Следует избегать подвергания образцов воздействию кислот, сильных оснований или высоких температур. Такие условия, как известно, наносят ущерб ДНК и могут привести к неправильности FISH-анализа. Несоблюдение всех процедур денатурации микроскопического препарата, гибридизации и детекции может привести к неприемлемым или ошибочным результатам. Для выявления целевых областей, окрашивание гематоксилином и эозином должны охватывать смежные области каждого десятого микроскопического препарата со срезами одного и того же блока ткани. Использование реагентов, не предусмотренных технической службой компании Abbott Molecular, может сказаться отрицательно на условиях гибридизации. Правильные условия хранения набора компонентов предусматривают использование набора до истечения срока годности. Несоблюдение условий хранения может негативно сказаться на результатах анализа. Смесь ДНК-зондов Vysis LSI RREB1/LSI MYB/LSI CCND1/CEP 6 содержит формамид, являющийся тератогенным фактором. Следует избегать попадания формамида на кожу и слизистые оболочки. Откалиброванные термометры являются необходимыми для измерения температур растворов, водяных бань и термостатов. Всегда проверяйте значения температур раствора для предварительной обработки и буферов для промывания, измеряя их в ёмкости Коплина откалиброванным термометром. Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с указаниями по утилизации опасных отходов вашего учреждения.

Распад

Флуорофоры легко обесцвечиваются при воздействии света. Для ограничения такой деградации следует сводить к минимуму количество света, попадающего на все растворы и микроскопические препараты, содержащие флуорофоры. Выполните в темноте все шаги, не требующие света (такие как инкубации и промывания).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СБОР ПРОБ И ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Образцы ткани, фиксированные в формалине и залитые парафином, помещают на предметные стекла. ДНК является денатурированной до одноцепочечной формы, что впоследствии позволяет ей гибридизоваться с ДНК-зондами Vysis LSI RREB1/LSI MYB /LSI CCND1/CEP 6. После гибридизации несвязанные зонды удаляются серией промываний, ядра обработаны DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole), ДНК специфически окрашена, что дает синюю флуоресценцию. Гибридизация с ДНК-зондами Vysis LSI RREB1/LSI MYB / LSI CCND1/CEP 6 просматривается с помощью флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующими возбуждающими и испускающими фильтрами, позволяющими визуализировать интенсивные флуоресцентные сигналы цвета морской волны, зеленого цвета, цвета золота и красного цвета.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Необходимые материалы

ДНК-зонд Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH (набор реактивов)

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- Промывочный раствор Hemo-De
- Гематоксилин и эозин
- Иммерсионное масло, подходящее для флуоресцентного микроскопа
- 20X SSC
- NP-40 (Nonidet P40)
- 1X SSC, pH 6.3
- Протеазный буфер II (0.2 N hydrochloric acid, HCl)
- Протеаза I (Pepsin 3000-4000 units/mg)
- Промывочный буфер 2XSSC, pH 7/ 0.3% NP-40
- Этанол 100%. Хранить при комнатной температуре.
- Очищенная вода
- Резиновый клей
- Предварительно очищенные силанизированные или положительно заряженные предметные стекла микроскопа
- Покровные стекла 20мм x 20мм
- дозатор (1-10мкл) и стерильные наконечники
- полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0.5мл или 1.5мл)
- таймер
- микротом
- магнитная мешалка
- вортекс
- микроцентрифуга
- статическая или циркулирующая водяная баня (37 ± 1°C)
- циркулирующие водяные бани (73 ± 1°C и 80 ± 1°C)

Примечание: при использовании статических водяных бань высоких температур адекватный температурный контроль невозможен.

- Водяная баня, свободная от протеинов (40°C)
- Вентилируемые термостаты (56°C)
- Алмазный писец
- Щипцы
- Одноразовый шприц (5мл)
- Ёмкости Коплина (14) предполагаемого типа: ёмкость для вертикального окрашивания Wheaton Product No. 900570
- Краситель DAPI I
- Флуоресцентный микроскоп
- pH-метр или бумага для измерения pH в узком диапазоне
- откалиброванный термометр

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• коробка для предметных стекол с крышкой
• прибор для денатурации/гибридизации ThermoBrite® или HYBrite™

Основное и дополнительное оборудование микроскопа
Микроскоп: для просмотра результатов гибридизации необходим эпилюминесцентный (флуоресцентный) микроскоп. Если существующий флуоресцентный микроскоп доступен, он должен быть проверен, чтобы убедиться в его исправности для обеспечения оптимального просмотра флуоресценции гибридизации *in situ* анализируемых образцов. ДНК, окрашенная общим методом, например, DAPI, пропидия йодидом или хинакрином не подходит для FISH анализа. Целесообразно производить обычную очистку микроскопа и периодическое техническое обслуживание представителем производителя, особенно это касается регулировки ртутной лампы. **Примечание:** предполагаемая негодность реагентов для анализа *in situ* может на самом деле указывать на нарушение работы или субоптимальное функционирование флуоресцентного микроскопа, либо на неправильный набор фильтров, используемых для просмотра. Рекомендуемый источник светового возбуждения: 100 Вт ртутная лампа. Следует записывать количество часов, в течение которых использовалась лампа, и заменить лампу после превышения номинального времени. Убедитесь, что лампа правильно отрегулирована. **Объективы:** используйте масляные иммерсионные объективы с числовым отверстиями ≥ 0,75 при использовании микроскопа с ртутной лампой мощностью 100 Вт или 100 Вт для увеличения срока службы лампы. Объективы 10X и 40X в сочетании с окулярами 10X подходят для сканирования. Для FISH-анализа удовлетворительные результаты могут быть получены при использовании масляного иммерсионного объектива 63x или 100X ахроматического типа иммерсионными объективами, должно быть одной из разработок для низкой автофлуоресценции, специально используемой во флуоресцентной микроскопии.
Фильтры: отдельные наборы фильтров для большинства моделей флуоресцентных микроскопов, оптимальные при работе с наборами ДНК-зондов CEP и LSI, имеются в наличии у Abbott Molecular. Рекомендуемые наборы фильтров для работы с ДНК-зондом Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH (набор реактивов): DAPI одно полосовой, Aqua одно полосовой, GreenV2 одно полосовой, Gold одно полосовой и Red одно полосовой. Гибридизация ДНК-зондов CEP 6, MYB, CCND1, and RREB1 в их целевых регионах отмечена цветом морской волны, золотой, зеленой и красной флуоресценцией соответственно. Остальные районы ДНК дадут синее свечение, обусловленное окрашиванием DAPI.

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: При наличии показаний, следует произвести измерение pH этих растворов при комнатной температуре. Используйте pH-метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

2X SSC / 0,3% NP-40 Раствор для промывания
Тщательно перемешайте 100 мл 20x SSC (pH 5,3) с 847 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40 и тщательно перемешайте, пока NP-40 полностью не растворится. Измерьте pH и доведите до pH 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавить очищенную H_2O, доведите конечный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Следует прекратить хранение раствора через 6 месяцев или раньше, если в растворе появится мутность или загрязнения.

Раствор для промывания Hemo-De
Заполнить три (3) ёмкости Коплина с 50 мл раствора для промывания Hemo-De.
Слить через одну (1) неделю.
Раствор для предварительной обработкиНалейте 50 мл 1X SSC pH 6,3 в ёмкость Коплина. Поместите ёмкость на циркулирующую водяную баню (80±1°C) до предварительной обработки микроскопических препаратов. Перед использованием убедитесь, что температура раствора 80 ± 1° C. Слить после одного (1) дня.

Раствор протеазы
Добавьте одну пробирку протеазы Protease I в один флакон протеазного буфера II. Закройте флакон и аккуратно переверните его несколько раз, чтобы перемешать. Поместите раствор протеазы в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ёмкость Коплина и поместите ёмкость Коплина на водяную баню (37±1 °C). Подождите минимум 1 час после смешивания, перед использованием убедитесь, что температура буфера составляет 37±1°C. Слить после одного (1) дня.

Очищенная вода
Наполните одну ёмкость Коплина 50 мл очищенной воды. Использовать при комнатной температуре.

Раствор этанола
Подготовьте v/v разведения 100% этанола очищенной H_2O, чтобы получить 75% и 85% растворы этанола. Между использованиями хранить при комнатной температуре. Слить растворы после 6 месяцев. Для рабочих растворов залить 70 мл 100% этанола в одну из трех ёмкостей, 70 мл 85% этанола в другую, и 70 мл 70% этанола в последнюю. Использовать при комнатной температуре. Слить после семи (7) дней для исключения понижения концентрации или испарения.

Процедура предварительной подготовки образцов
Процедура предварительной подготовки образцов

Примечание: следующая процедура предварительной обработки была оптимизирована для использования фиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани кожи. Если происходит ускоренное расщепление образца, уменьшите время воздействия протеазы на пять минут. Если происходит замедленное расщепление образца, увеличьте время воздействия протеазы на пять минут. Обратитесь к разделу «Устранение проблем». Для поддержания соответствующих температур растворов рекомендуется обрабатывать в ёмкости Коплина по четыре микроскопических препарата. Если у вас меньше, чем четыре препарата, добавьте пустые предметные стекла, имеющие комнатную температуру, чтобы в общей сложности их было четыре. Образцы готовятся в расчете на четыре предметных стекла с одним или двумя 22x22 мм покровными.

Подготовка образцов препаратов для микроскопирования
Примечание: используйте образцы тканей кожи, которые были зафиксированы в формалине не более чем на 24 часа, хорошо обработаны и произведены из хороших участков ткани. Аккуратно используйте лабораторные техники, чтобы не произошло перекрестного загрязнения в процессе подготовки препаратов.
1. Нарежьте образец, залитый парафином, на фрагменты толщиной 4-6 мкм с помощью микротома.
2. Опустите срезы на поверхность очищенной (т. е. трижды дистиллированной) воды водяной бани (40 °C).
3. Поместите срезы на положительно заряженные предметные стекла.
4. Высушите стекла на воздухе.
5. Выполните обычное H & E окрашивание каждого среза на одном предметном стекле.
6. H & E окрашенные образцы должны быть просмотрены специалистом, который отмечает (обводит) регионы с доминирующим очагом опухоли чернильным маркером или алмазным писцом. Описание соответствующих клеток для выявления на образце, окрашенном H & E, приводится в разделе «Распознавание выходных сигналов». С помощью алмазного писца описываются соответствующие регионы неокрашенных препаратов на обратной от образца стороне.
7. Высушивать неокрашенные препараты следует 1.5 часа при 56°C.
8. Процесс подготовки неокрашенных препаратов соответствует ниже приведенным процедурам.

Депарафинизация препаратов
1. Погрузите препараты в раствор для промывания Hemo-De на 5 минут при комнатной температуре.
2. Дважды повторите шаг 1, используя каждый раз свежий раствор для промывания Hemo-De.
3. Высушите препараты в 100%-ом этаноле в течение 1 минуты при комнатной температуре. Повторите.
4. Немедленно приступайте к предварительной обработке препаратов.

Предварительная обработка препаратов
1. Погрузите препараты в 1X SSC pH 6,3 при температуре 80±1°C на 35 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. При необходимости, два препарата могут быть помещены один за другим в каждую прорезь ёмкости Коплина, при этом в каждой концевой прорези находится по одному препарату. Лицевые стороны конечных препаратов с образцами ткани должны быть обращены к центру ёмкости.
3. Погрузите препараты в очищенную воду на 3 минуты.

Предварительная протеазная обработка
1. Удалите препараты из ёмкости с очищенной водой.
2. Удалите излишки воды, промокая края препарата о бумажное полотенце.
3. Погрузите препараты в раствор Протеазы I при 37 ° C на 15 минут.
4. При необходимости, два препарата могут быть помещены один за другим в каждую прорезь ёмкости Коплина, при этом в каждой концевой прорези находится по одному препарату. Лицевые стороны конечных препаратов с образцами ткани должны быть обращены к центру ёмкости.
5. Погрузите препараты в очищенную воду на 3 минуты.

Процедура гибридизации
См. Руководство пользователя Thermo Brite или HYBrite для получения дополнительной информации о том, как использовать инструмент.
1. Погрузите препараты в 70% этанол на 1 минуту.
2. Погрузите препараты в 85% этанол на 1 минуту.
3. Погрузите препараты в 100% этанол на 1 минуту.
4. Высушите препараты на столике с подогревом или на воздухе.
5. Смочите полоску бумажного полотенца водой и положите её в каналах вдоль поверхности нагрева HYBrite или смочите водой влажную карту и поместите её в прорези для карт ThermoBrite.
6. Установите значение **Melt Temp** 73°C и значение **Melt Time** 5 минут. Установите значение **Hyb Temp** 37 °C и значение **Hyb Time** минимум 16 часов.
7. Отметьте районы гибридизации алмазным писцом на предметном стекле образца и местонахождение препарата на ThermoBrite или HYBrite.
8. Перемешайте смесь с зондом для хорошего растворения. Быстрое вращение ДНК-зонда собирает раствор на дне пробирки и удаляет пузырьки воздуха.
9. Нанесите 10 мкл смеси зонда на предметное стекло и сразу же накройте покровным стеклом.
10. Уплотните края покровного стекла резиновым клеем.
11. Запустите программу ко-гибридизации.
В конце периода гибридизации (минимум 16 часов), переходите к процедуре промывания препаратов, описанной ниже.

Процедура промывания препаратов
Налейте 50 мл 2X SSC/0.3% NP-40 в ёмкость Коплина. Перед использованием поместите ёмкость на водяную баню (73±1°C) на 30 минут. Перед использованием убедитесь, что температура раствора для промывания составляет 73±1°C. Раствор может быть использован в течение 1 дня, затем его следует слить. Налейте 50 мл 2X SSC/0.3% NP-40 в дополнительную ёмкость Коплина. Использовать при комнатной температуре. Раствор может быть использован в течение 1 дня, затем его следует слить.

Примечание: Для поддержания соответствующей температуры в 2x SSC/0.3% NP-40, следует промывать четыре предметных стекла одновременно. Если у вас меньше, чем четыре препарата, добавьте пустые предметные стекла, имеющие комнатную температуру, чтобы в общей сложности их было четыре. Начните отсчет времени, когда четвертый препарат будет погружен.

1. Удалите резиновый клей из одного препарата, минимально нарушая покровное стекло, и погрузите препарат в раствор для промывания 2x SSC/0.3% NP-40 комнатной температуры. Проделайте ту же процедуру с другими препаратами и дайте постоять 2-5 минут, чтобы дать покровным стеклам отсоединиться от предметных.
2. Погрузите препараты в предварительно нагретый промывочный раствор 2X SSC/0.3% NP-40. Повторите то же с другими препаратами.
3. Удалите препараты через 2 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание: Перед промыванием следующих четырех препаратов убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1°C.

Визуализация гибридизации

1. Просушите предметные стекла на воздухе в темноте.
2. Нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI в целевую область препарата (отмеченную на стекле) и накройте покровным стеклом. До наблюдения образца на микроскопе дайте DAPI проникнуть в ткани в течение 15 минут.

Примечание: препараты должны быть проанализированы в течение 30 минут после нанесения DAPI или храниться непосредственно при температуре -20 ° C.

3. Проанализируйте образцы с помощью флуоресцентного микроскопа в течение 1 недели.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Интерпретация результатов FISH-анализа возможна только в том случае, если использовались фиксированные формалином, залитые в парафин ткани кожи человека.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетке с нормальным числом копий генов RREB1, MYB, CCND1 и центромерного участка хромосомы 6, будет наблюдаться два сигнала цвета морской волны (хромосома 6), два зеленых сигнала (CCND1), два сигнала (MYB) цвета золота и два красных сигнала (RREB1). Аномальное число копий гена RREB1 дает большее или меньшее число сигналов, чем два красных сигнала зонда. Аномальное число копий гена MYB дает большее или меньшее число сигналов, чем два сигнала цвета золота. Одновременно, число копий хромосомы 6 может количественно соответствовать числу сигналов цвета морской волны, наблюдаемых в пределах одной клетки. Таким образом, перечисление красных RREB1, цвета золота MYB и сигналов цвета морской волны КЭП 6 обеспечивает механизм для определения абсолютного числа копий генов RREB1 и MYB, а также количество копий генов RREB1 и MYB по отношению к общему числу копий хромосомы 6. Аномальное число копий гена CCND1 дает большее или меньшее число сигналов, чем два сигнала зелёного цвета. Следует обратить внимание, что нарезка образца, залитого в парафин, является причиной усечения ядер, что приводит к тому, что в некоторых ядрах возникает меньше сигналов, чем должно быть на самом деле. Например, из-за ядерного усечения в некоторых нормальных ядрах будет меньше, чем по два сигнала генов RREB1, MYB, CCND1 и CEP 6. Это явление учитывается в порогах чувствительности, которые были использованы в критериях оценки; см. «**Характерные эксплуатационные особенности»:** «Метод определения состояния меланомы».

ОТЧЁТ О РЕЗУЛЬТАТАХ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Оценка соответствия препаратов.

Оценка соответствия препаратов производится с использованием следующих критериев:

• Интенсивность сигнала зонда: сигналы должны быть яркими, отчётливыми и легко анализируемыми.

• Специфичность сигнала зонда: сигналы должны быть либо сжатыми, компактными, овальной формы, либо волокнистыми, диффузными, овальной формы.

• Фон: фон должен быть тёмным или чёрным и относительно свободным от флуоресцентных частиц или туманности. Если любая из указанных выше особенностей не соответствует критериям, указанным выше, следует обратиться к Таблице 1 «Устранение проблем» и обработать свежие препараты, если это возможно.

Распознавание выходных сигналов.

Должны учитываться только сигналы гибридизации, исходящие от меланоцитов, являющихся составной частью новообразования. Для поиска трех областей, в которых опухолевые клетки преобладают над стромальными, просмотрите определенный регион среза, окрашенного H & E. Избегайте областей с обильной контаминацией воспалительными клетками или другими стромальными компонентами. Лучшие области для подсчёта те, в которых ядра меланоцитов отличаются друг от друга и не слишком плотно примыкают друг к другу. Область некроза опухоли

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

следует избегать. Как только лучшая область обнаружилась на срезе, окрашенном H & E, изучите описанную гибридизованную область препарата при небольшом увеличении с использования DAPI фильтра. Данную область лучше всего изучать под объективом 10X, который позволяет легко найти регионы препаратов, окрашенных H & E.

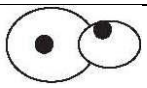
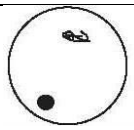
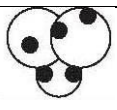
Оценка клеток.

Как только область, которая отвечает критериям, описанным выше, была определена, перейдите на объектив 40x или 63x и оцените с помощью каждого из предписанных фильтров интенсивность сигнала гибридизации сигнала и сравните ее с фоновой флуоресценцией. Выбор области скопления для оценки должен быть основан на быстром скрининге аномальных областей с подсчётом сигналов всех четырех зондов. В регионе многочисленных скоплений в том случае, если от отдельного скопления исходит либо высокий, либо низкий зондовый сигнал, выберите данное отдельное скопление. Выбор отдельных клеток должен быть случайным и основанным на идентификации клеток, в которых нет перекрытия ядер и сигналы зонда яркие и характерные. Перейдите на объектив 63x или 100X. Начните анализ с левого верхнего квадранта поля зрения и продвигайтесь слева направо, подсчитывая число сигналов в каждом интерфазном ядре. Избегайте ядер с плохо определенной границы. Фокусируйте вверх и вниз, чтобы найти все сигналы, исходящие от ядер. Тесно сопоставленные сигналы одного канала флуоресценции, которые имеют одинаковый размер и не отделены друг от друга расстоянием, равным или большим, чем диаметр одного сигнала, должны учитываться как один сигнал (см. руководство по подсчёту сигналов). Ядра, не испускающие сигналы, должны быть исключены из какого-либо анализа. Если вы постоянно видите отсутствие одного из четырех зондов в опухолевых клетках, убедитесь, что вы видите сигналы зонда в соседних нормальных клетках, таких как лимфоциты, кератиноциты или другие стромальные клетки, чтобы подтвердить, что зонд гибридизирован правильно.

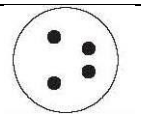
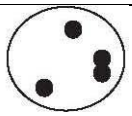
Для каждого ядра подсчитайте число сигналов RREB1, MYB, CCND1 и CEP 6. (**Примечание:** будет необходимо чередовать красный, цвета золота, зелёный V2, цвета морской волны и DAPI одно полосовые наборы фильтров см. RREB1 (красный), MYB (цвета золота), CCND1 (зеленый) и CEP 6 (цвета морской волны) сигналы).

Зарегистрируйте 30 неперекрывающихся ядер. Если это возможно, ядра должны быть выбраны из 3 различных регионов опухоли. **Если будет зарегистрировано меньше, чем 30 ядер, анализ будет рассматриваться как несодержательный.**

Рисунок 1
ДНК-зонд Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH (набор реактивов)

1.		Не подсчитывайте, пропустите. Это может быть две клетки с одним сигналом в каждом ядре или одно искривленное ядро.
2.		Считайте как два сигнала: один сигнал очень сжатый, второй – диффузный.
3.		Не подсчитывайте, пропустите. Исследователь не сможет сказать, какая именно клетка испускает сигнал.
4.		Считайте как два сигнала, один сигнал делится.
5.		Считайте как три сигнала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.		Считайте как четыре сигнала.
7.		Считайте как три сигнала, один сигнал делится.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Если интерпретация сигнала гибридизации затруднена и недостаточно образцов для повторного анализа, анализ считается несодержательным. Если клетки в количестве, недостаточном для анализа, анализ считается несодержательным.

Таблица 1

Руководство по устранению проблем

Проблема	**Причина возникновения проблемы**	**Решение**
• Нет сигнала или сигналы слабые	• Для просмотра препаратов используется несоответствующий набор фильтров	• Используйте соответствующий набор фильтров
	• Микроскоп не функционирует должным образом	• Вызовите представителя фирмы-производителя микроскопа
	• Неправильная лампа (т.е. ксеноновая или вольфрамовая)	• Используйте ртутную лампу (рекомендуемая мощность 100 Ватт)
	• Ртутная лампа слишком старая	• Поменяйте на новую
	• Ртутная лампа не отрегулирована	• Отрегулируйте лампу
	• Грязные или треснувшие линзы коллектора	• Очистите или замените линзы
	• Грязное или разбитое ламповое зеркало	• Очистите или замените зеркало
	• Несоответствующие условия гибридизации	• Проверьте настройки по ThermoBrite или HyBrite
		• Увеличьте время гибридизации как минимум до 16 часов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Несоответствующая температура при пост-гибридизационном промывании	• Проверьте температуру растворов для промывания. Она должна быть 73°C. • Следует понизить температуру промывочного раствора до 73°C.
	• Воздушные пузырьки скопились под покровным стеклом и мешают прохождению сигнала	• Поместите покровное стекло на поверхность гибридизационной смеси одним касанием
	• Недостаточное количество гибридизационного раствора для среза	• Увеличьте количество гибридизационного раствора для среза до 20 мкл
	• Недостаточное протеазное расщепление	• Проверьте температуру водяной бани 37±1°C • Проверьте pH буфера 1.0±0.2 • Увеличивайте время протеазного расщепления с шагом в 5 минут
	• Срез перефиксирован (границы клеток будут различимы)	• Оптимальное время фиксации при подготовке парафиновых препаратов 24 часа или меньше. Более длительная фиксация приведёт к прогрессивной потере сигнала.
	• ДНК потеряна (плохо окрашена DAPI)	• Проверьте условия фиксации
• Изменение интенсивности сигнала при прохождении через срез ткани	• Присуще многим срезам ткани	• Проверьте окрашивание DAPI. Если окрашивание DAPI в слабых регионах хорошее, оцените препарат.
	• Зонд неравномерно распределен в препарате из-за скопления пузырьков	• Повторите гибридизацию на другом срезе и убедитесь, что под покровным стеклом нет пузырьков воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	воздуха под покровным стеклом • Слишком большой срез	• Увеличьте объем гибридизационной смеси до 20мкл
• Шумовой фон	• Недостаточная жесткость растворов для промывания	• Проверьте pH промывочных растворов. Если значение pH лежит вне диапазона от 7.0 до 7.5, буфер нужно слить. • Проверьте температуру растворов для промывания. Она должна быть 73°c. • Следует повысить температуру промывочного раствора до 75°c.
• Потеря или морфологическая деградация ткани	• Срезы ткани недостаточно зафиксированы (бедное окрашивание DAPI) • Использование несоответствующих предметных стекол • Неправильная сушка препарата • Сверх-предварительная обработка • Сверхденатурация • Срезы ткани были разорваны при удалении покровного стекла после гибридизации	• Проверьте условия/время фиксации ткани • Используйте положительно заряженные предметные стекла • Проверьте температуру печи 56°C • Проверьте температуру предварительной обработки 80±1°C • Уменьшите время предварительной обработки • Уменьшите время протеазного расщепления • Уменьшите время денатурации • Удалите замачиванием покровного стекла в буфере для промывания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Введение

FISH-анализ был проведен с помощью ДНК-зонда Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH (набор реактивов) на 56 образцах (FFPE) биопсии кожи как часть тестового возможного исследования. Все образцы биопсии были однозначно классифицированы специалистом либо как меланома (25), либо как невусы (31) опухолей кожи, использовались срезы, окрашенные H & E. Число копий генов RREB1, MYB, CCND1 и околоцентромерной области хромосомы 6 были оценены с использованием FISH-зондов для соответствующих регионов. Тридцать клеток из трех различных регионов (как минимум) внутри опухоли были просчитаны на четыре FISH зонда. Статус меланомы был определен по методике, описанной ниже.

Метод определения статуса меланомы

1. Определите и запишите число RREB1, MYB, CCND1 и CEP 6, насчитанное в каждом из 30 ядер.
2. Добавить все ядра, где число RREB1 - сигналов больше или меньше, чем 2 сигнала, что является аномальным для RREB1.
3. Разделите число ядер, аномальных по числу RREB1-сигналов (шаг 2), на общее число насчитанных ядер, затем умножьте на 100. Полученная величина представляет собой процент ядер, аномальных по числу RRE1-сигналов.
4. Добавьте все MYB-сигналы. Эта сумма представляет собой общее количество MYB-сигналов.
5. Разделите общее количество MYB-сигналов на число насчитанных ядер. Эта сумма представляет собой среднее количество MYB-сигналов в ядрах.
6. Добавьте все CCND1-сигналы. Эта сумма представляет собой общее количество CCND1-сигналов.
7. Разделите общее количество CCND1 сигналов на число насчитанных ядер. Эта сумма представляет собой среднее количество CCND1-сигналов в ядрах.
8. Добавьте все ядра, где количество MYB-сигналов меньше, чем количество CEP 6 сигналов. Эта сумма представляет собой количество ядер, показывающее потерю MYB относительно CEP 6.
9. Разделите общее количество ядер, которые показывают убыток MYB относительно CEP 6 (шаг 8), на общее число насчитанных ядер. Умножьте на 100. Полученная величина представляет собой процент потери MYB относительно CEP 6.
10. Считать образец как FISH-меланома-положительный, если:
a. среднее число CCND1-сигналов в ядрах или среднее число MYB-сигналов в ядрах ≥ 2,5, OR; b. процент потери MYB-сигналов относительно CEP 6≥ 31, OR;
c. процент ядер, аномальных по числу RREB1-сигналов≥ 63%.
11. Считать образец как FISH-меланома-отрицательный, если ни один из критериев пункта 10 не выполнен.

Анализ данных

В Таблице 2 приведены средние проценты и стандартные отклонения (SD) ядер с увеличенным числом сигналов (> 2 сигналов), с уменьшенным числом сигналов (<2 сигнала), а также прибыль или убыток (аномальные ядра) для каждого локуса в 31 образце невуса. Кроме того, приведены для каждого локуса, нормальные для ядер, сигналы (соотношение) и их стандартные отклонения. Последняя строка содержит значения для MYB-локуса относительно CEP 6, для которых ядро классифицируются как имеющее увеличенное число сигналов, если MYB-сигналов> CEP6-сигналов, или уменьшенное, если MYB сигналов <CEP 6 сигналов и общее соотношение среднего числа MYB-сигналов / CEP 6-сигналов. В Таблице 3 содержится такая же информация для 25 образцов меланомы. В этом исследовании средние соотношения CCND1/ядро, MYB / ядро, процент ядер с аномальным числом RREB1 и процент ядер с потерей MYB относительно CEP 6 оказались наиболее полезными параметрами для диагностики меланомы. Урезание данных для каждого из этих четырех параметров происходило отдельно при определении их оптимальных значений, и в результате чувствительность и специфичность данных построены на Рисунке 2 (приведены только точки данных, имеющих высокую чувствительность для каждого специфического значения). Точки,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

лежащие ближе всего к 100% чувствительности и специфичности, были созданы с помощью урезания значений данных (см. выше в разделе **Метод определения статуса меланомы)**, вызванная чувствительность = 92%, специфичность = 94%.

Таблица 2
Уровень хромосомных аберраций, определенных с помощью FISH-анализа, в 31 невус-образце

Набор невус-образцов									
Проба	Количество Образцов	Ср.% клеток с увел. Числом сигналов	Ст. Откл. % клеток с увел. Числом сигналов	Ср.% клеток с убытком	Ст. Откл. % клеток с убытком	Ср. % клеток с аномальными ядрами	Ср. Откл. % клеток с аномальными ядрами	Нормальные сигналы для ядер	Ср.откл. Нормального сигнала
CCND1 RREB1 MYB CEP 6 MYB/CEP 6	31 31 31 31 31	4.61 8.98 10.22 6.02 28.16	7.17 11.66 12.21 7.8 10.30	41.02 35.65 45.27 50.97 18.04	14.81 14.61 14.32 15.93 8.19	45.63 44.62 55.48 56.99 46.20	12.97 12.34 11.48 12.54 11.71	1.60 1.75 1.64 1.53 1.08	0.28 0.30 0.30 0.28 0.13

Таблица 3
Уровень хромосомных аберраций, определенных с помощью FISH-анализа, в 25 меланома-образцах

Набор меланома-образцов													
Проба	Количество Образцов	Ср.% клеток с увел. Числом сигналов	Ст. Откл. % клеток с увел. числом сигналов	Р-значение прибыли	Ср.% клеток с убытком	Ст. Откл. % клеток с убытком	Р-значение убытка	Ср. % клеток с аномальными ядрами	Ср. Откл. % клеток с аномальными ядрами	Р-значение аномальных ядер	Нормальные сигналы для ядер	Ср.откл. Нормального сигнала	Р-значение Нормальных сигналов
CCND1 RREB1 MYB CEP 6 MYB/CEP 6	25 25 25 25 25	28.33 42.91 22.81 25.10 28.86	31.58 29.08 19.95 21.74 16.84	0.00100 0.00001 0.00900 0.00020 0.86000	31.14 18.21 35.43 33.74 30.59	20.72 14.23 18.32 17.14 20.42	0.05000 0.00004 0.03000 0.00030 0.01000	59.47 61.12 58.24 58.84 59.45	18.55 19.96 13.50 12.74 13.57	0.0030 0.0009 0.4200 0.5900 0.0003	2.82 2.43 1.93 1.96 1.01	2.95 0.59 0.50 0.50 0.28	0.050 0.000 0.030 0.000.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

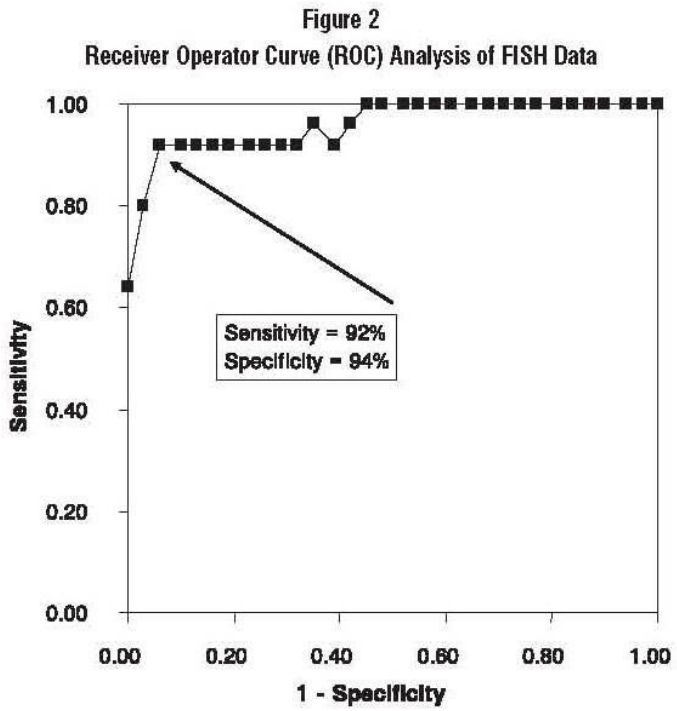


Figure 2 – Рисунок 2

Receiver Operator Curve (ROC) Analysis of FISH Data – кривая ROC-анализа FISH-данных

Sensitivity - чувствительность

Specificity - специфичность

1. American Cancer Society. *A Cancer Journal for Clinicians, Global Cancer Statistics 2002*. Atlanta: American Cancer Society; 2006.
2. Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW. Cutaneous Melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. *Am Fam Physician.* 2005;72(2):269-76.
3. Veenhuizen KCW, De Wit PEJ, Mooi WJ, et al. Quality assessment by expert opinion in melanoma pathology: experience of the pathology panel of the Dutch Melanoma Working Party. *J Pathol.* 1997;182:266-72.
4. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, et al. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol.* 2003;163(5):1765-70.
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.

Техническая поддержка

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте компании Abbott Molecular http;//www.abbottmolecular.com.

Использование прямых меченых флуоресцентных ДНК-зондов Vysis LSI и CEP и использование смесей составных прямых меченых ДНК-зондов Vysis защищено Европейским Патентом (EP) 5, 491, 224, выданным технической службе компании Abbott Molecular. Использование Vysis LSI и CEP зондов защищено Европейским патентом RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696 и 5, 756, 696 и 6, 607, 877 и Европейскими патентами EP 1, 929, 044, ассигнованном в Йельском университете и лицензировано исключительно для технической службы компании Abbott Molecular. ДНК-зонд Vysis для генетической диагностики меланомы методом FISH (набор реактивов) и его использование распространяются в рамках европейских патентных заявок. CEP, LSI и Vysis являются зарегистрированными товарными знаками технической службы компании Abbott Molecular. SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumGold, SpectrumRed и HYBrite являются зарегистрированными товарными знаками группы компаний различной юрисдикции Abbott.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Система ThermoBrite Denaturation/Hybridization System является зарегистрированным товарным знаком Iris Sample Processing, Inc.
Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2007, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Сентябрь 2020
30-608220/R7

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis DDIT3 Break Apart FISH Probe Kit

en

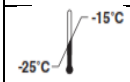
REF 03N57-020

30-608246/R4

Vysis DDIT3 Break Apart FISH Probe Kit
REF 03N57-020
30-608246/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная проба для проведения флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) предназначена для выявления хромосомных перестроек, затрагивающих ген DDIT3 (CHOP), расположенный на хромосоме 12q13.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

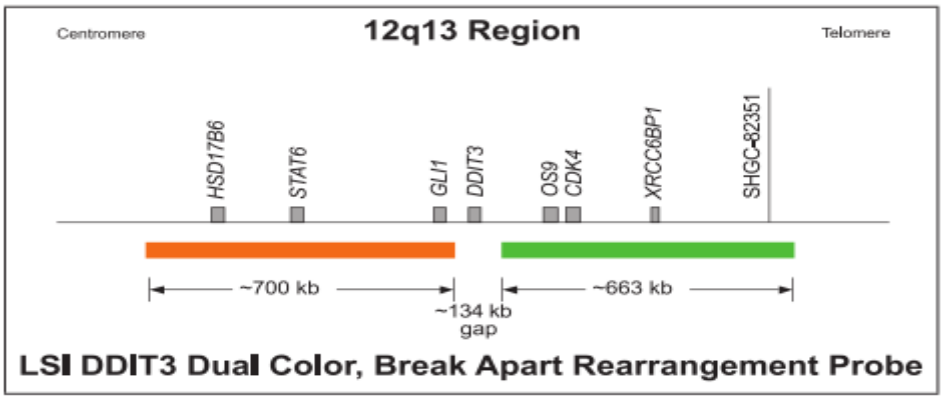
Хромосомные перестройки с участием гена DDIT3, локализованного на хромосоме 12q13 часто встречаются при миксоидных липосаркомах (МЛС), а также были обнаружены в круплоклеточных и смешанных липосаркомах (комбинированные миксоидные и крупноклеточные клетки). Уникальная транслокация t (12;16) q(13;p11) присутствуют более чем в 95% случаев МЛС и рассматриваются как диагностический маркер для МЛС/RC. t(12;16) приводит к слиянию (и дерегуляции транскрипции) генов TLS (FUS) и DDIT3, C-EBP-семейства фактора транскрипции, учавствующего в дифференцировке адипацитов[1,2,4]. Гибридизация с LSI DDIT3 (12q13) двухцветной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

пробы для реаранжировки идентифицирует хромосомную перестройку в гене DDIT3, но не специфическое слияние гена-партнера.
DDIT3 двухцветная проба для реаранжировки используется в различных исследованиях для выявления реаранжировок гена DDIT3 (12q13). Vysis LSI DDIT3 двухцветная проба для реаранжировки успешно обнаружила перестройки гена DDIT3 (CHOP) в 18/18 фиксированных в формалине, заключенных в парафин тканях миксоидной липосаркомы[3]. Matsui и др. использовали LSI DDIT3 (CHOP) двухцветный зонд для реаранжировки (Abbott Mol. Inc) для подтверждения перестроек в гене DDIT3 в редких случаях МЛС, несущих хромосомную транслокацию t(12;22)(q13;12), приводящую к слиянию генов EWS-DDIT3[4].

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Vysis DDIT3 (12q13) Dual Color Break Apart реарранжировки состоит из смеси двух проб FISH DNA. Первая проба, размером 700 kB, мечена флуорохромом SpectrumOrange располагается проксимальнее гена DDIT3. Вторая проба, меченая флуорохромом SpectrumGreen, располагается дистально от гена DDIT3, размером приблизительно 663 кВ.

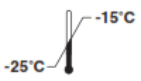


РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI DDIT3 (12q13) Dual Color Break Apart проба реаранжировки (номер партии 30-231020) (1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 550 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826)
(1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

Хранение



Зонд Vysis DDIT3 Break Apart FISH Probe Kit методики необходимо хранить при температуре -20ºC (±5°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis DDIT3 Break Apart FISH Probe Kit осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI DDIT3 (12q13) Dual Color Break Apart, проба реаранжировки.

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[5]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Фиксированные в формалине, заключенные в парафин образцы тканей помещаются на слайды с использованием стандартных процедур.
Для подготовки образцов, заключенных в парафин для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимальной проницаемости тканей и гибридизации с использованием стандартных процедур.

Методика
Необходимые материалы
- Зонды LSI DDIT3 (12q13) Dual Color Break Apart
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.
   ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Извлеките стекла через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации
1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.
Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение
Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации
Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.
Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации
1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры
Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.
При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
Положительные и отрицательные контрольные слайды должны использоваться вместе с образцами пациентов.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
Для интерфазного использования, отдельные лаборатории должны публиковать аналитически нормальную точку отсечения для интересующего атипичного паттерна сигналов[5].

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
В нормальном интерфазном ядре, гибридизованном с зондом LSI DDIT3 (12q13) Dual Color Break Apart Rearrangement Probe наблюдается два слитных паттерна сигналов (2F), отражающих 2 неповрежденных интактных копии гена DDIT3. В атипичных ядрах с транслокацией или другой простой хромосомной перестройке одной копии региона гена DDIT3, ожидается один зеленый, один оранжевый и один слитный сигналы. Интерпретация результатов FISH должна быть получена с использованием соответствующих контролей и аналитической техники, а также с учетом других клинических данных и диагностических тестов[5].

Ошибочные результаты коденатурации
Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	FISH или фильтры микроскопа повреждены.	
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Knight JC, Renwick PJ, Dal Cin P, et al. Translocation t(12;16) (q13;p11) in Myxoid and Round Cell Liposarcoma: Molecular and
Cytogenetic Analysis. *Cancer Research* 1995;55:24-27.
2. Antonescu CR, Tschernyavsky SJ, Decuseara R, et al. Prognostic Impact of P53 Status, *TLS-CHOP* Fusion Transcript Structure, and Histological Grade in Maxoid Liposarcoma: A Molecular and Clinicopathologic Study of 82 Cases. *Clinical Cancer Research* 2001;7:3977-3987.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Downs-Kelly E, Goldblum JR, Patel RM, et al. The utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of myxoid soft tissue neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2008;32(1):8-13.
4. Matsui Y, Ueda T, Kubo T et al. A novel type of *EWS-CHOP* fusion gene in myxoid liposarcoma. *Bioch Biophys Res Com* 2006;348:437-440.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. 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.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI DDIT3 Break Apart FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, 977, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020 Abbott. Все права защищены.

www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608246R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis FUS Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 03N58-020

30-608247/R4

Vysis FUS Break Apart FISH Probe Kit
REF 03N58-020
30-608247/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Законный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию.
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Этот зонд для проведения флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) предназначен для детекции хромосомных перестроек, включающих ген FUS, локализованный на хромосоме 16p11.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Хромосомные перестройки, включающие ген FUS, локализованный на хромосоме 16p11, наблюдались во многих типах опухолей, включая саркомы мягких тканей (CMT). Различные типы CMT характеризуются специфическими хромосомными транслокациями, включающими t (12;16) (q13;p11) FUS-DDIT3 (Миксоидная липосаркома), t (16;21) (p11; q22) FUSERG (Острый миелоидный лейкоз), t(12;16) (q13; p11) FUS-ATF1 (Ангиоматоидная фиброзная гистиоцитома) и t (7;16) (q32-34; p11) FUS-CREB3L2 (низкодифференцированная фибромиксоидная саркома).

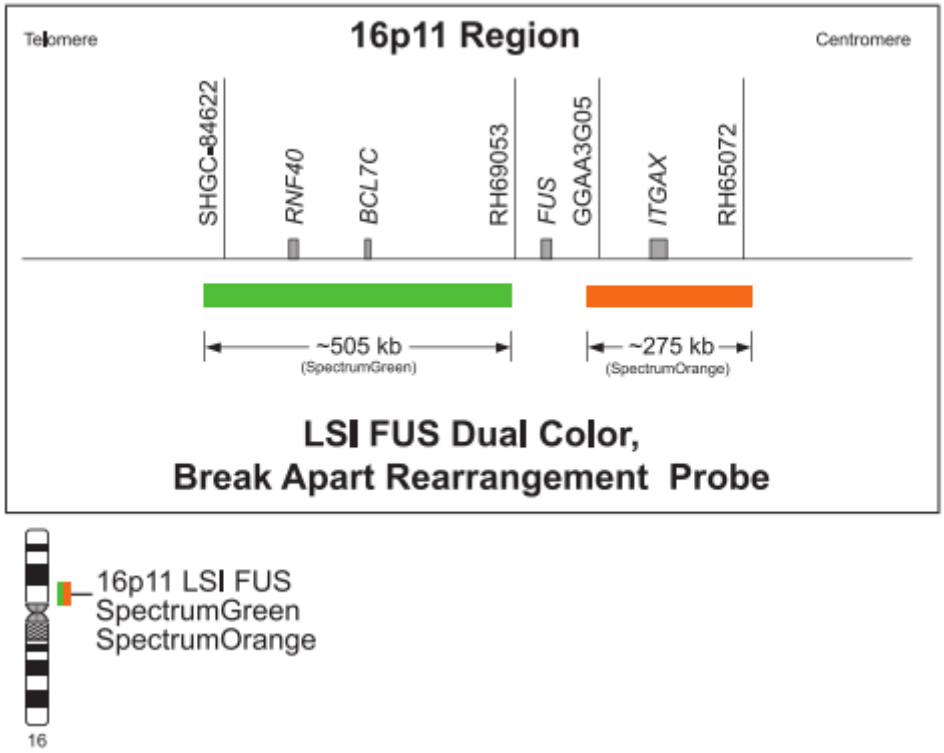
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В результате химерного слияния белков - главных трансактиваторов, вызывающих дерегуляцию дифференциации контроля на клетках-мишенях опухоли.[1,2] Гибридизация с LSI FUS (16p11) Dual Color, Break Apart FUS (16p11) определяет хромосомные перестройки в регионе гена FUS, но не в специфическом гене-партнере.

FUS-FISH-зонды успешно использовались для подтверждения диагноза на различные типы сарком как было продемонстрировано в нескольких исследованиях. С помощью пробы Vysis LSI FUS (16p11) Dual Color, Break Apart Rearrangement были выявлены реаранжировки в гене FUS в 7 из 10 фиксированных в формалине, заключенных в парафин тканях низкодифференцированных фибромиксоидных сароком[3]. В других исследованиях Vysis LSI FUS (16p11) Dual Color, Break Apart Rearrangement использовалась для выявления в гене FUS в редких случаях саркомы Юинга, несущей вариант хромосомной транслокации t(2;16) (q35;p11), что приводит к гену слияния FUS-FEV[4].

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Проба Vysis LSI FUS (16p11) Dual Color, Break Apart Rearrangement представляет собой смесь двух проб. Первая проба, размером 505 kB, меченая флуорохромом SpectrumGreen, располагается дистально к гену FUS. Вторая проба, меченая флуорохромом SpectrumOrange, лежит проксимально от гена FUS, длиной 275 kB.



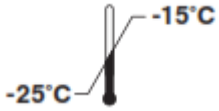
Реагенты

1. Зонд Vysis LSI FUS Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (16p11) (серия № 30-231032)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 400 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP® (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия хранения



Зонд Vysis LSI FUS (16p11) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Условия транспортировки

Во время транспортировки **Vysis FUS Break Apart FISH Probe Kit** транспортируется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD Только для диагностического использования *In Vitro*.

Vysis LSI FUS (16p11) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[6].

Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P501 Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.
20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.
Сбор образцов и подготовка анализа
Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани должны быть помещены на слайды с использованием стандартных процедур. Для подготовки заключенных в парафин образцов для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимизации проницаемости тканей и гибридизации с помощью стандартных процедур.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Методика

Требуемые материалы

- Vysis LSI FUS (16p11) Dual Color, Break Apart
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Столик для нагрева стекол с препаратами

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.

Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.

Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.

При проведении гибридизации проб CEP и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.

- Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
- Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более 4 стекол в сосуды Коплина одновременно.

- Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH**. ПРИМЕЧАНИЕ:** Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подержите препараты в 100% этаноле, пока все препараты полностью н высохнут и нанесите пробу.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы, когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов.

Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Процедура быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1– секунды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температура промывочных растворов 73±1ºC, прежде, чем промывать другие 4 слайда.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через интервал от 5 секунд до 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Визуализация гибридизации

- Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
- На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения микроскопических стекол с образцами, пробами и покровными стеклами на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, их удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
1 мкл очищенной H2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (± 1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа - или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл конткрасителя на целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[5].

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В нормальных интерфазных ядрах, гибридизуемых с Vysis LSI FUS (16p11) Dual Color Break Apart Rearrangement Probe это два слитных сигнала паттернов и отображают две неповрежденные копии гена FUS. В атипичных ядрах с транслокацией t (16p11) или другой простой перестройкой одной копии гена FUS это один оранжевый, один зеленый и один слитный паттерны сигналов. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[5].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Perez-Mancera PA, Sanchez-Garcia I. Understanding mesenchymal cancer: the liposarcoma-associated *FUS-DDIT3* fusion gene as a model. *Seminar Cancer Biol.* 2005;15:206-14.
2. Mertens F, Fletcher CDM, Antonescu CR, et al. Clinicopathologic and molecular genetic characterization of low-grade fibromyxoid sarcoma, and cloning of a novel *FUS/CREB3L1* fusion gene. *Lab Invest.* 2005;85:408-15.
3. Downs-Kelly E, Goldblum JR, Patel RM, et al. The utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of myxoid soft tissue neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(1):8-13.
4. Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ et al. Ewing Sarcoma with Novel Translocation t(2;16) Producing an In-Frame Fusion of *FUS* and *FEV.J Mol Diagn.* 2007;9(4):459-463.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. 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, PA 19087-1898 USA.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая помощь:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

®2008,2020 Abbott. Все права защищены

www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608247/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis SS18 Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 03N61-020

30-608250/R4

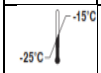
Vysis SS18 Break Apart FISH Probe Kit

REF 03N61-020

30-608250/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная проба для проведения флуоресцентной гибридизации in situ предназначена для выявления хромосомных перестроек, захватывающих ген SS18 (SYT), локализованного на хромосоме 18q11.2.

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

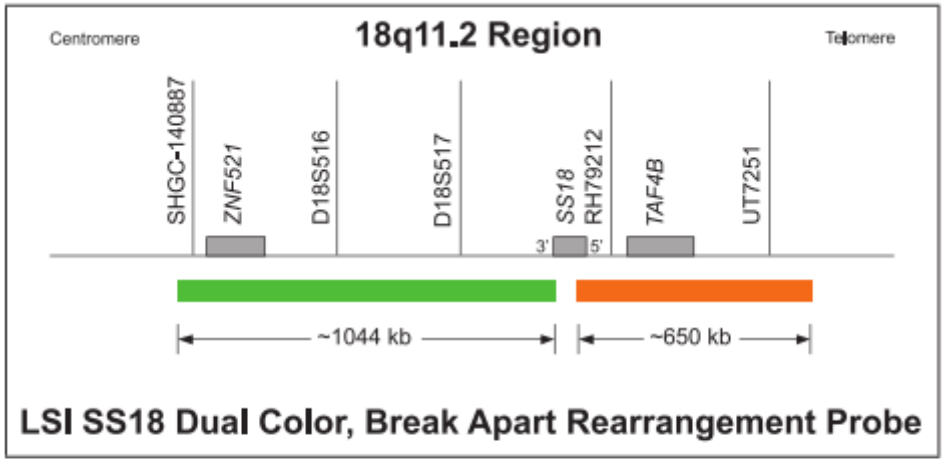
Хромосомные перестройки с участием гена SS18, локализованного в точке разрыва на хромосоме 18q11.2 часто встречаются среди синовиальных сарком мягких тканей[1]. Несколько исследований показали, что транслокации t (X;18) (p11.2; q11.2) возникает исключительно в синовиальной саркоме (СС)[2]. Гибридизация с пробой Vysis LSI SS18 (18q11.2) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe выявляет хромосомные перестройки в гене SS18, но не у специфического гена-партнера. Как было показано ранее, SS18 проба break apart является надежным диагностическим инструментом для выявления нарушений SYT в синовиальных саркомах.[3-5] В исследовании 134 залитых в парафин опухолевых тканей, в которых СС был предпочтительным диагнозом с использованием зонда Vysis LSI SS18 (18q11.2) Dual Color, Break Apart Rearrangement, выявлено 86% положительных случаев. Таким образом, чувствительность и специфичность комбинации методов FISH и ПЦР с обратной транскрипцией для диагностики синовиальной саркомы составляет 96 % и 100 % соответственно.[6] Однако при использовании зонда для метода тканевых матриц лучше

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

применять FISH, что связано с возможность выбора способа нанесения в зависимости от условий фиксации. FISH облегчает визуализацию, в т.ч. микроскопический контроль истинно положительных результатов, и позволяет выявить прямую взаимосвязь между транслокацией и морфологией образца, залитого парфином.[4,7]

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis SS18 состоит из двух ДНК-зондов для FISH. Первый зонд длиной около 650 килобаз, маркированный в SpectrumOrange, располагается дистальнее гена SS18. Второй зонд длиной 1 044 килобазы, маркированный в SpectrumGreen, располагается на 3’ конце или проксимальнее гена SS18.

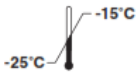


РЕАГЕНТЫ

1. Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI SS18 (18q11.2) (серия № 30-231018) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 800 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ



Набор разъединяющих зондов Vysis SS18 для FISH следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки набор разъединяющих зондов Vysis SS18 для FISH обкладывают сухим льдом.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI SS18 (18q11.2) Dual Color, Break Apart

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[9], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[10], CLSI документ M29-A3[11], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[12].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[5]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор

Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)

- Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI SS18 (18q11.2)
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипетка (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлаженную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).
1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Совместная денатурация
Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[8].

Ожидаемые результаты
Предполагается, что гибридизация нормальных интерфазных ядер с помощью двухцветного разъединяющего перегруппировочного зонда Vysis LSI SS18 (18q11.2) приведет к появлению двух сигналов слияния, отражающих две интактные копии SS18. В патологических ядрах с транслокацией t(18q11.2) или с другими простыми хромосомными перестройками одной копии участка гена SS18 будет наблюдаться один оранжевый, один зеленый сигнал и один сигнал слияния

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(1O1G1F). Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[8], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1.Sandberg A, Bridge J. Update on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Synovial sarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2002;133:1-23.

2. Dos Santos N, de Bruijn DRH, et al. Molecular mechanisms underlying human synovial sarcoma development. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2001;30:1-14.

3. Terry J, Barry TS, Horsman DE, et al. Fluorescence In Situ Hybridization for the Detection of t(X;18)(p11.2;q11.2) in a Synovial Sarcoma Tissue Microarray Using a Breakapart-Style Probe. *Diagnostic Molecular Pathology* 2005;14(2):77-82.

4. Ten Heuvel SE, Hoekstra HJ, Suurmeijer AJH. Diagnostic Accuracy of FISH and RT-PCR in 50 Routinely Processed Synovial Sarcomas. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2008;16(3):246-250.

5. Lazar A, Abruzzo LV, Pollock RE, et al. Molecular Diagnosis of Sarcomas. Chromosomal Translocations in Sarcomas. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2006;130:1199-1207.

6. Subramaniam MM, Noguera R, Piqueras M, et al. Evaluation of genetic stability of the *SYT* gene rearrangement by break-apart FISH in primary and xenotransplanted synovial sarcomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007;172:23-28.

7. Amary MFC, Berisha F, Bernardi FC, et al. Detection of SS18-SSX fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded neoplasms: analysis of conventional RT-PCR, qRT-PCR and dual color FISH as diagnostic tools for synovial sarcoma. *Modern Pathology* 2007;20:482-496.

8. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genetics in Medicine* 2006;8(1):16-23.

9. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.

10. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.

11. 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.

12. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Использование зонда Vysis LSI SS18 осуществляется на основании европейского патента № 5,663,319 и 5, 491, 224 и 5, 491б 224 приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента № RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280 929 и 6, 607, 877, приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange и HYBrite являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608250/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis MYC SpectrumOrange FISH Probe Kit

en

REF 03N87-020

30-608429/R3

Vysis MYC SpectrumOrange
FISH Probe Kit
REF 03N87-020
30-608429/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления расширения локуса MYC (C-MYC), расположенного на участке 8q24.12-q24.13.

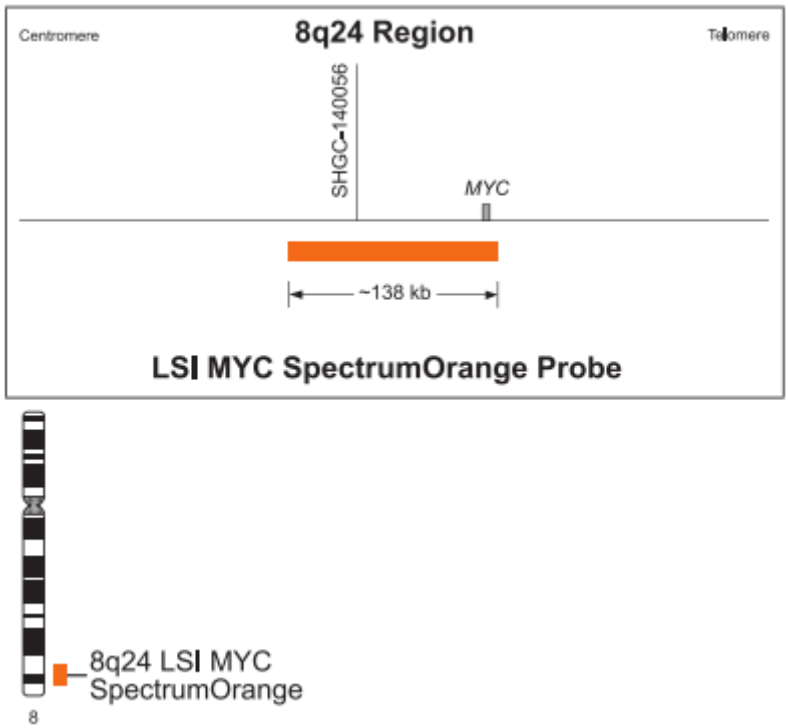
Описание процедуры и пояснения

Известно, что расширение онкогена MYC (C-MYC) наблюдается более чем в 20 % случаях рака молочной железы и других злокачественных новообразованиях, а также служит прогностическим фактором для рака молочной железы.[1-3] FISH представляет собой быстрый и воспроизводимый метод, позволяющий точно определить степень расширения онкогена с интерфазных ядрах опухолевых клеток человека.[4] Данный зонд можно использовать для определения количества копий MYC или изучения участка 8q24 в целом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

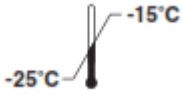
Зонд Vysis LSI MYC SpectrumOrange применялся в нескольких исследованиях. Park и др. использовали зонд для изучения совместного расширения генов MYC и HER2 у 214 с раком молочной железы.[5] Для выявления рака легких Sokolava и др. сравнили анализ, основанный на FISH с использованием зонда, с традиционной цитологией на бронхиальных смывах 74 пациентов. Согласно полученным результатам FISH является более чувствительным методом (82 % и 54 %).[6] Недавно Rygiel и др. провели исследование, в котором зонд Vysis LSI MYC (8q24.12-q24.13) они использовали для оценки расширения MYC, являющегося диагностическим маркером пищевода Барретта с выраженной дисплазией или аденокарциномой пищевода.[7]

Описание зонда
Длина зонда Vysis LSI MYC составляет около 138 килобаз. Зонд мечен SpectrumOrange и содержит около 5 килобаз гена MYC от экзона 1 до экзона 3, т.е. покрывает практически целую кодирующую область.



Реагенты
1. Зонд Vysis MYC SpectrumOrange (серия № 30-190006)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 100 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению



The Vysis LSI MYC SpectrumOrange FISH Probe Kit. Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Условия транспортировки
Во время транспортировки Двухцветная проба разрывов перестройки Vysis LSI IGH транспортируется на сухом льду.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Только для диагностического использования *In Vitro*.

Vysis LSI MYC SpectrumOrange Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа
Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани должны быть помещены на слайды с использованием стандартных процедур. Для подготовки заключенных в парафин образцов для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимизации проницаемости тканей и гибридизации с помощью стандартных процедур.

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI MYC SpectrumOrange
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Столик для нагрева стекол с препаратами

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.

- Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
- Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более 4 стекол в сосуды Коплина одновременно.

- Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH**.** ПРИМЕЧАНИЕ**:** Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подержите препараты в 100% этаноле, пока все препараты полностью н высохнут и нанесите пробу.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.**

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: **Если препараты готовы, когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.**

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов.

Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Процедура быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.**

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1– секунды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температура промывочных растворов 73±1ºC, прежде, чем промывать другие 4 слайда.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через интервал от 5 секунд до 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Визуализация гибридизации

- Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
- На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения микроскопических стекол с образцами, пробами и покровными стеклами на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, их удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
1 мкл очищенной H2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (± 1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа - или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл конткрасителя на целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[8].

Ожидаемые результаты
В ядре с расширением локуса MYC будет наблюдаться больше двух копий оранжевого сигнала. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[8].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. **Подготовка слайдов для коденатурации** • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Deming SL, Nass SJ, Dickson RB et al. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurence and prognostic relevance. *British Journal of Cancer* 2000;83(12):1688-1695.
2. Nesbit CE, Tersak JM, and Prochownik EV. *MYC* oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene 1999*;18:3004-3016.
3. Schlotter CM, Vogt U, Bosse U, et al. C-*myc*, not *HER-2/ neu*, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. *Breast Cancer Research* 2003;5(2):30-36.
4. Persons DL, Borelli KA, Hsu PH. Quantitation of HER-2/neu and c-myc gene amplification in breast carcinoma using fluorescence in situ hybridization. *Modern Pathology* 1997;10(7):720-727.
5. Park K, Kwak K, Kim J, et al. c-*myc* amplification is associated with *HER2* amplification and closely linked with cell proliferation in tissue miroarray of nonselected breast cancers. *Human Pathology* 2005;36:634-639.
6. Sokolova IA, Bubendorf L, O'Hare A, et al. A Fluorescence In Situ Hybridization-Based Assay for Improved Detection of Lung Cancer Cells in Bronchial Washing Specimens. *Cancer Cytopathology* 2002;96(5):307-315.
7. Rygiel AM, Milano F, ten Kate FJ et al. Gains and Amplifications of *c-myc*, *EGFR*, and *20.q13* Loci in the No Dysplasia DysplasiaAdenocarcinoma Sequence of Barrett's Esophagus. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2008;17(6)1380-1385.
8. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genetics in Medicine* 2006;8(1):16-23.
9. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
10. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
11. 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.
12. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020 Abbott. Все права защищены

www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608429/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis CCND1/CEP 11 FISH Probe Kit

en

REF 03N88-020

30-608430/R3

Vysis CCND1/CEP 11
FISH Probe Kit
REF 03N88-020
30-608430/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-15°C -25°C	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для подсчета количества копий локуса Cyclin D1, расположенного на участке 11q13, или в качестве счетчика для 11-ой хромосомы в интерфазных и метафазных клетках.

Описание процедуры и пояснения

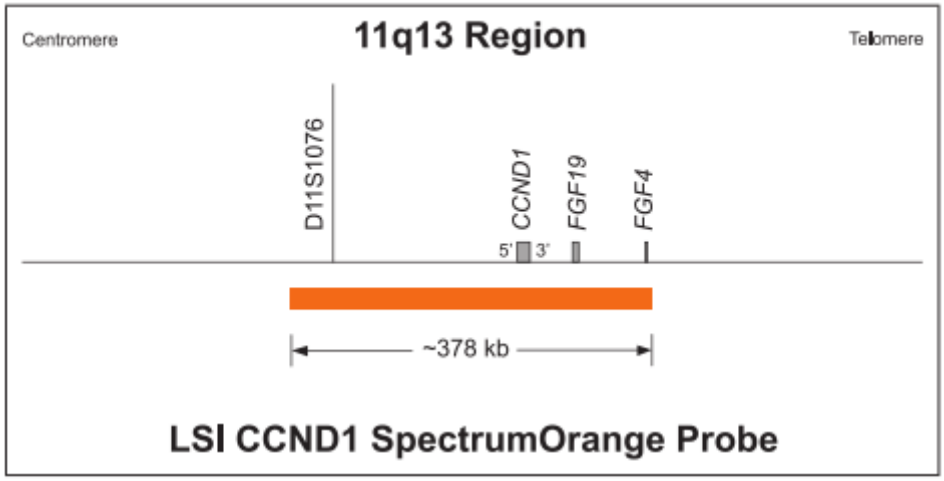
Расширение участка 11q13, содержащего онкоген Cyclin D1 (CCND1, PRAD1) наблюдается в 15 % случаев рака молочной железы. Расширение CCND1 является прогностическим маркером.[1-3]

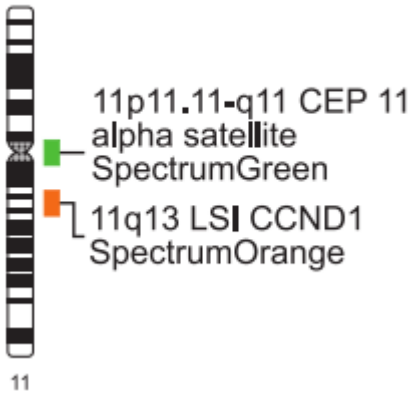
В нескольких исследованиях набор зондов Vysis CCND1/CEP 11 FISH использовался для выявления расширения CCND1 в образцах злокачественной опухоли молочной железы. Al-Karaya и др. с помощью метода тканевых матриц и набора зондов изучили 2 197 образцов подобных опухолей и обнаружили расширение CCND1 в 20,1 % случаев.[4] Расширение CCND1 свидетельствует о низкой дифференцировки опухоли и плохой выживаемости. Jirstrom и др. с помощью метода тканевых матриц изучили 500 образцов подобных опухолей, взятых у пациентов, которые получали или не получали тамоксифен.[5] Согласно результатам исследования расширение CCND1 является

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

агонистом тамоксифена, а пациенты с расширением CCND1 имеют статистически достоверно высокий риск рецидива.
Зонды Vysis LSI CCND1 SpectrumOrange/CEP11 SpectrumGreen также используются и при других видах рака. Например, Katz и др.[6] обнаружили, что увеличение количества копий CCND1 является чувствительным признаком лимфомы из клеток мантийной зоны и позволяет отличить данный вид лимфомы от большинства других В-клеточных неходжкинских лимфом.

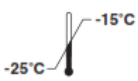
Описание зонда
Флаконы с зондами Vysis LSI CCND1 SpectrumOrange/CEP11 SpectrumGreen содержат смесь двух зондов. Длина зонда CCND1 составляет около 378 килобаз, содержит ген CCND1 и мечен SpectrumOrange. Второй зонд специфичен для альфа сателлита D11Z1, повторяющегося в области центромеры 11-ой хромосомы (11p11.11-q11), и мечен SpectrumGreen.





Реагенты
1. Зонды Vysis LSI CCND1 SpectrumOrange/CEP11 SpectrumGreen (серия № 30-191039)
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 300 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ



Vysis CCND1/CEP11 FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки
Набор Vysis CCND1/CEP11 транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI CCND1 SpectrumOrange/CEP11 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[9], CLSI документ M29-A3[10], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[11].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[8]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI CCND1 SpectrumOrange/CEP11 SpectrumGreen
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Стеклянные сосуды Коплина
● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипетка (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[7].

Ожидаемые результаты
В интерфазных ядрах нормальных клеток, содержащих две копии Cyclin D1 и две копии 11-ой хромосомы, будут наблюдаться два оранжевых и два зеленых сигнала (2O2G). В патологических клетка, содержащие увеличенное количество копий CCND1 без расширения CEP11 будут наблюдаться два зеленых и множественные оранжевые сигналы. При наличии других генетических аномалий могут появиться другие сигналы. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[7], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	микропрепараты недостаточно высушены.	70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

микропрепараты высушены недостаточно.	% и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Schuuring E, Verhoeven E, Tinteren Hv et al. Amplification of genes within the chromosome 11q13 region is indicative of poor prognosis in patients with opearble breast cancer. *Cancer Research* 1992;52:5229-5234.
2. Bieche I, Olivi M, Nogues C et al. Prognostic value of *CCND1* gene status in sporadic breast tumors, as determined by real-time quantitative PCR assays. *British Journal of Cancer* 20002;86:580-586.
3. Ormandy CJ, Musgrove EA, Hui R, et al. Cyclin D1, EMS1 and 11q13 amplification in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2003;78:323-335.
4. Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Research* 2004;64:8534-8540.
5. Jirstrom K, Stendahl M, Ryden L, et al. Adverse effect of adjuvant Tamoxifen in premenopausal breast cancer with *Cyclin D1* gene amplification. *Cancer Research* 2005;65(17):8009-8016.
6. Katz RL, Caraway NP, Gu J, et al. Detection of chromosome 11q13 breakpoints by interphase fuorescence in situ hybridization. *American Journal of Clinical Pathology* 2000;114:248-257.
7. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genetics in Medicine* 2006;8(1):16-23.
8. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. 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, PA 19087-1898 USA.
11. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:
Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июнь 202
30-608430/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis TOP2A/CEP 17 FISH Probe Kit

en

REF 03N89-020

30-608431/R3

Vysis TOP2A/CEP 17
FISH Probe Kit
REF 03N89-020
30-608431/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для подсчета количества копий TOP2A и 17-ой хромосомы, что позволяет отличить расширение и делецию TOP2A от анеусомии по 17-ой хромосоме.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ И ПОЯСНЕНИЯ

Ген TOP2A, расположенный на участке 17q21-q22, кодирует топоизомеразу II-α, основной фермент, участвующий в репликации ДНК, клеточном цикле и расщеплении хромосом.[1,2] Таким образом, белок TOP2A является молекулярной мишенью для многих ингибиторов.[3] Согласно данным нескольких исследований TOP2A является маркером, по которому можно судить об эффективности различных препаратов, применяемых для химиотерапии.[4,5] При раке молочной железы у человека наблюдается совместное расширение генов TOP2A и HER-2. Выявление данной патологии может помочь в подборе индивидуального плана лечения.[6] Зонды Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/CEP17

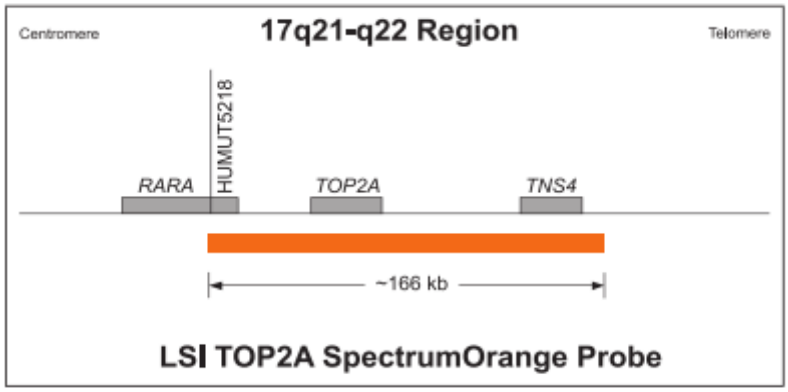
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

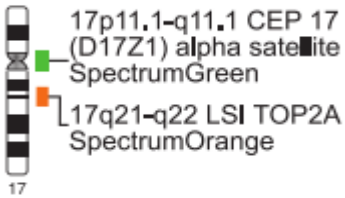
SpectrumGreen содержат специфический зонд для TOP2A и центромерный зонд для 17-ой хромосомы (CEP17). Каждый зонд мечен определенным флуорофором, что позволяет провести точный подсчет каждого локуса.

Состояние гена TOP2A представляет интерес в связи с тем, что топоизомераза II-α является молекулярной мишенью для антрациклинов. Mueller и др. использовали набор зондов Vysis TOP2A/CEP17 для изучения корреляции между количеством копий TOP2A и экспрессией топоизомеразы II-α при раке молочной железы. У 81 пациента с раком молочной железы по количеству копий TOP2A не удалось судить об экспрессии белка.[7] Используя тот же набор зондов, Park и др. изучили опухоли 284 пациентов с раком молочной железы, получавших вспомогательную терапию на основе доксорубицина. Целью исследования был поиск взаимосвязи между examined tumors from 284 breast расширением или делецией TOP2A и исходом заболевания.[8]

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

Флаконы с зондами Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/CEP17 SpectrumGreen содержат смесь двух зондов. Зонд TOP2A длиной около 166 килобаз представляет собой уникальную последовательность, меченную в SpectrumOrange, гибридизируемую на участок 17q21-q22 17-ой хромосомы и содержащую ген топоизомеразы II-α длиной 30 килобаз. Зонд CEP17 гибридизирует на альфа-сателлитную ДНК 17-ой хромосомы (17p11.1-q11.1); мечен в SpectrumGreen. Смесь зондов находится в гибридизационном буфере.

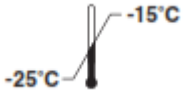




Реагенты

1. Зонды Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/CEP17 SpectrumGreen (серия № 30-190095) (1 флакон, 200 мкл/флакон). 300 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению



The Vysis TOP2A/CEP17 FISH Probe Kit. Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки Vysis TOP2A/CEP17 FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

IVD Только для диагностического использования *In Vitro*.

Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[10], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[11], CLSI документ M29-A3[12], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[13]. Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа
Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани должны быть помещены на слайды с использованием стандартных процедур. Для подготовки заключенных в парафин образцов для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимизации проницаемости тканей и гибридизации с помощью стандартных процедур.

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/CEP17 SpectrumGreen

Требуемые, но не предоставляемые материалы
- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Столик для нагрева стекол с препаратами

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.

- Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
- Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более 4 стекол в сосуды Коплина одновременно.

- Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH**. ПРИМЕЧАНИЕ:** Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подержите препараты в 100% этаноле, пока все препараты полностью н высохнут и нанесите пробу.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

   7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP

   1 мкл зонда

   2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы, когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов.

Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Процедура быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1– секунды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температура промывочных растворов 73±1ºC, прежде, чем промывать другие 4 слайда.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через интервал от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

- Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
- На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis... **Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения микроскопических стекол с образцами, пробами и покровными стеклами на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, их удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
1 мкл очищенной H2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (± 1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа - или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл конткрасителя на целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[9], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ожидаемые результаты
В интерфазных ядрах нормальных клеток, содержащих две копии TOP2A и две копии 17-ой хромосомы, будут наблюдаться два оранжевых и два зеленых сигнала (2O2G). В случае расширения или делеции гена TOP2A оранжевых сигналов будет больше или меньше. При наличии других генетических аномалий могут появиться другие сигналы. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[9], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту.
3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз.
4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

Подготовка слайдов для коденатурации

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
	Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Tsai-Pflugfelder M, Liu LF, Liu AA, et al. Cloning and sequencing of cDNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988;85(19):7177-7181.
2. Chen AY, Liu LF. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34:191-218.
3. Capranico G, Zunino F, Kohn KW, et al. Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives inSV40 DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity. *Biochemistry* 1990;29(2):562-569.
4. Arriola E, Socorro MR, Lambros MBK, et al. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment* 2007;106:181-189.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Nielsen KV, Ejlertsen B, Moller S, et al. The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D. *Acta Oncologica* 2008;4(47):725-734.
6. Bofin AM, Ytterhus B, and BM Hagmar. TOP2A and HER-2 gene amplification in fine needle aspirates from breast carcinomas.
Cythopathology 2003;14(6):314-319.
7. Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, et al. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of Topoisomerase II alpha protein in human breast cancer samples. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2004;39:288-297.
8. Park K, Han S, Gwak GH, et al. Topoisomerase II-alpha gene deletion is not frequent as its amplification in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2006;98:337-342.
9. 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.
10. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009. [Also available online: *Type* > www.cdc.gov, *search* > BMBL5 > *look up* sections III and IV.]
11. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
13. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июнь 2020
30-608431/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis TOP2A/HER-2/ CEP 17 FISH Probe Kit

en

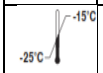
REF 03N90-020

30-608432/R4

Vysis TOP2A/HER-2/CEP 17 FISH Probe Kit
REF 03N90-020
30-608432/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для подсчета количества копий TOP2A, HER-2 и 17-ой хромосомы, что позволяет отличить расширение и делецию TOP2A и HER-2 от анеусомии по 17-ой хромосоме.

Описание процедуры и пояснения

Ген TOP2A, расположенный на участке 17q21-q22, кодирует топоизомеразу II-α, основной фермент, участвующий в репликации ДНК, клеточном цикле и расщеплении хромосом.[1,2] Таким образом, белок TOP2A является молекулярной мишенью для многих ингибиторов.[3]

Ген TOP2A расположен теломернее онкогена HER-2, который находится на участке 17q11.2-q12. HER-2 является представителем семейства рецепторов трансмембранных белков.[4,5] Близкое расположение генов HER-2, TOP2A и других генов, расположенных на участке 17q, дает предпосылки к появлению взаимосвязи между ними. Кроме того, в клеточных линиях и при раке молочной железы у человека наблюдается совместное расширение генов TOP2A и HER-2.[6]

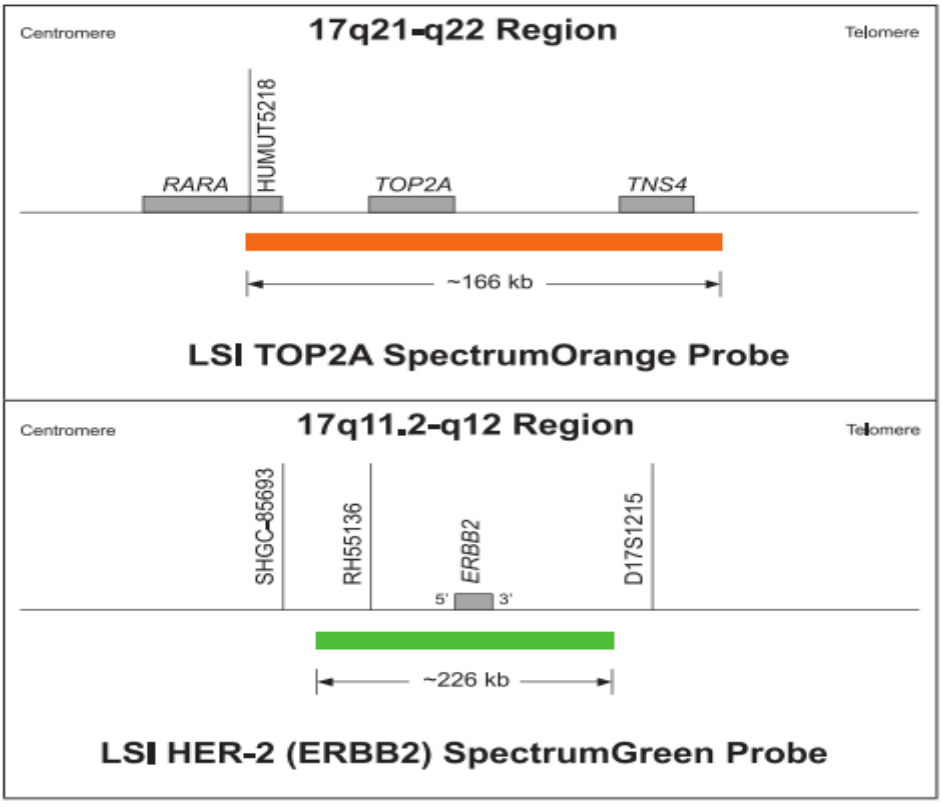
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

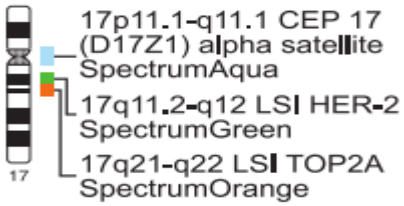
Набор зондов Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/HER-2 SpectrumGreen/CEP17 SpectrumAqua содержат специфический зонд для TOP2A и HER-2 и центромерный зонд для 17-ой хромосомы. Каждый зонд мечен определенным флуорофором, что позволяет провести точный подсчет каждого локуса. Одновременный подсчет всех трех проб позволяет определить увеличение или уменьшение количества копии. Кроме того, данный многоцветный зонд дает возможность отличить истинное расширение или делецию генов от анеусомии по 17-ой хромосоме или усечения ядер.

Состояние генов TOP2A и HER-2 представляет интерес в связи с тем, что топоизомераза II-α является молекулярной мишенью для антрациклинов, а ген HER-2 является мишенью нескольких небольших молекул ингибиторов тирозинкиназы и антител против белка рецептора HER-2. Beser и др. использовали набор зондов Vysis TOP2A/HER-2/CEP17 для FISH для изучения частоты расширения и делеции гена TOP2A по отношению к состоянию гена HER-2 и анеусомии по 17-ой хромосоме у 50 пациентов с раком молочной железы.[7] Hicks и др. использовали данный набор зондов для изучения взаимосвязи между повреждениями генов TOP2A и HER-2 и анеусомией по 17-ой хромосоме у 138 пациентов с раком молочной железы.[8]

Описание зонда

Флакон с зондами Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/HER-2 SpectrumGreen/CEP17 SpectrumAqua содержит смесь трех зондов, находящихся в гибридизационном растворе. Зонд TOP2A длиной около 166 килобаз представляет собой уникальную последовательность, меченную в SpectrumOrange, гибридизируемую на участок 17q21-q22 17-ой хромосомы и содержащую ген топоизомеразы II-α длиной 30 килобаз. Зонд HER-2, охватывающей весь ген HER-2 на участке 17q11.2-q12, представляет собой уникальную последовательность длиной около 226 килобаз. Зонд мечен в SpectrumGreen. Зонд CEP17 гибридизирует на альфа-сателлитную ДНК 17-ой хромосомы (17p11.1-q11.1); мечен в SpectrumAqua. Смесь зондов находится в гибридизационном буфере.



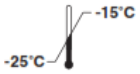


Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

Зонды Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/HER-2 SpectrumGreen/CEP17 SpectrumAqua (серия № 30-191095) (1 флакон, 200 мкл/флакон). 500 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ



Vysis TOP2A/HER-2/CEP17 FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Набор Vysis TOP2A/HER-2/CEP17 FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/HER-2 SpectrumGreen/CEP 17 SpectrumAqua Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[10], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[11], CLSI документ M29-A3[12], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[12].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[8]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды LSI TOP2A SpectrumOrange/HER-2 SpectrumGreen/CEP17 SpectrumAqua

Необходимые материалы (не в комплекте)
● 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
● 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
● Стеклянные сосуды Коплина
● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипетка (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.

ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлаженную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических[9] методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ожидаемые результаты
В интерфазных ядрах нормальных клеток, содержащих по две копии TOP2A, HER-2 и 17-ой хромосомы, будут наблюдаться два оранжевых, два зеленых сигнала и два сигнала Aqua. В случае расширения или делеции гена TOP2A и/или HER-2 оранжевых (TOP2A)/зеленых (HER-2) сигналов будет больше или меньше. Появление двух сигналов Aqua свидетельствует о наличии двух копий 17-ой хромосомы, что является нормой. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[9], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида.
2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту.
3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз.
4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации.

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Tsai-Pflugfelder M, Liu LF, Liu AA, et al. Cloning and sequencing of cDNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988;85(19):7177-7181.
2. Chen AY, Liu LF. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34:191-218.
3. Capranico G, Zunino F, Kohn KW, et al. Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40 DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity. *Biochemistry* 1990;29(2):562-569.
4. Arriola E, Socorro MR, Lambros MBK, et al. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment* 2007;106:181-189.
5. Nielsen KV, Ejlertsen B, Moller S, et al. The value of TOP2A gene copy number variation as a biomarker in breast cancer: Update of DBCG trial 89D. *Acta Oncologica* 2008;4(47):725-734.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Smith K, Houlbrook S, Greenall M, et al. Topoisomerase II alpha co-amplification with *erbB2* in human primary breast cancer and breast cancer cell lines: relationship to m-AMSA and mitoxantrone sensitivity. *Oncogene* 1993;8(4):933-938.
7. Beser AR, Tuzlali S, Guzey D, et al. HER-2, TOP2A and chromosome17 alterations in breast cancer. *Pathology Oncology Research* 2007;13(3):180-185.
8. Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, et al. The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Human Pathology* 2005;36:348-356.
9. 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.
10. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
11. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards. *Bloodborne Pathogens.*
12. 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, PA 19087-1898 USA.
13. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization; 2004.

Техническая поддержка:
Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020 Abbott. Все права защищены
www. abbottmolecular.com
Июнь 2020
30-608432/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ZNF217 SpectrumOrange FISH Probe Kit

en

REF 03N91-020

30-608433/R3

Vysis ZNF217 SpectrumOrange
FISH Probe Kit
REF 03N91-020
30-608433/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-15°C -25°C	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для подсчета количества копий *ZNF217* на участке 20q13.2.

Описание процедуры и пояснения

Существует мнение, что онкоген ZNF217 играет ключевую роль в процессе малигнизации. Ген ZNF217 расположен на участке 20q13, расширение которого часто наблюдается при различных видах опухолей.[1-6]

Расширение гена *ZNF217* при раке молочной железы свидетельствует об агрессивности опухоли и плохом клиническом прогнозе.[7]

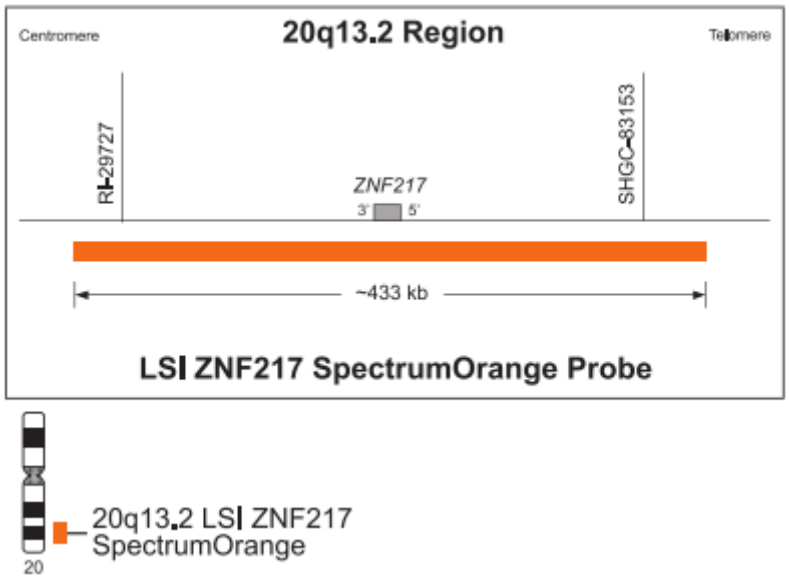
Зонд Vysis LSI ZNF217 (20q13.2) SpectrumOrange использовался в исследовании, результаты которого свидетельствуют о различной роли генов, расширение которых наблюдается при раке молочной железы у женщин, и их значимости для патогенеза рака грудной железы у мужчин. С помощью зонда Vysis SpectrumOrange LSI ZNF217 и другие зондов Vysis, в т.ч. LSI HER-2, LSI CCND1, LSI MYC и соответствующих центромерических зондов флуоресцентная гибридизация *in situ* выполнена на образцах ткани 128 мужчин с раком молочной железы.[8]

В другом исследовании зонд Vysis LSI ZNF217 (20q13.2) SpectrumOrange использовался для выявления расширения *ZNF217* в качестве основного патологического признака и прогностического

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

фактора при опухолях гортани. В данном исследовании анализ проведен на образцах ткани 863 пациентов с раком гортани[9].

Описание зонда
Зонд Vysis LSI ZNF217 SpectrumOrange представляет собой уникальную последовательность длиной 433 килобазы, меченную в SpectrumOrange, гибридизируемую на участок 20q13.2 20-ой хромосомы и содержащую ген ZNF217 длиной 16,1 килобаз.



Реагенты
1. Зонд Vysis LSI ZNF217 SpectrumOrange (серия № 30-190016) флакон, 20 мкл/флакон). 100 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ

Набор зондов Vysis ZNF217 SpectrumOrange для FISH следует хранить при температуре не выше -20°C (±5°C) и беречь от света.

Условия транспортировки
Во время транспортировки набор зондов Vysis ZNF217 SpectrumOrange для FISH обкладывают сухим льдом.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**
Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis LSI ZNF217 SpectrumOrange Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[11], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[12], CLSI документ M29-A3[13], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[14].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[11]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI ZNF217 SpectrumOrange
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипетка (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.
Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).
1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.[10]

Ожидаемые результаты
В интерфазных ядрах нормальных клеток, содержащих две копии ZNF217, будут наблюдаться два оранжевых сигнала. В случае расширения гена ZNF217 оранжевых сигналов будет больше. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.[10]

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Collins C, Rommens JM, Kowbel D, et al. Positional cloning of ZNF217 and NABCI: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998;95:8703-8708.
2. Yang SH, Seo MY, Jeong HJ, et al. Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2005;11:612-620.
3. Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, et al. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Research* 1995;55(24):6172-6180.
4. Zhu H, Lam DC, Han KC, et al. et al. High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumor genes in lung cancer cell lines. *Cancer Letters* 2007;245:303-314.
5. Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, et al. Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Research* 2002;62(23):6803-6807.
6. Lassmann S, Weis R, Markowiec F, et al. Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and timor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *Journal of Molecular Medicine* 2007;85(3):293-304.
7. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, et al. Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clinical Cancer Research* 1995;1:1455-1461.
8. Barlund M, Kuukasjarvi T, Syrjakoski K, et al. Frequent amplification and overexpression of CCND1 in male breast cancer. *International Journal of Cancer* 2004;111:968-971.
9. Koynova D, Tsenova V, Kunev K, et al. Tissue microarray study of ZNF217 copy number changes in Larynx Carcinoma. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2006;128-131.
10. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genetics in Medicine* 2006;8(1):16-23.
11. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
13. 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.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Vysis ZNF217 SpectrumOrange FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июнь 2020
30-608433/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ETV6 Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 04N09-020

30-608466/R3

Vysis ETV6 Break Apart
FISH Probe Kit
REF 04N09-020
30-608466/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-15°C -25°C	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления хромосомных перестроек с участием гена ETV6, расположенного на участке 12p13.

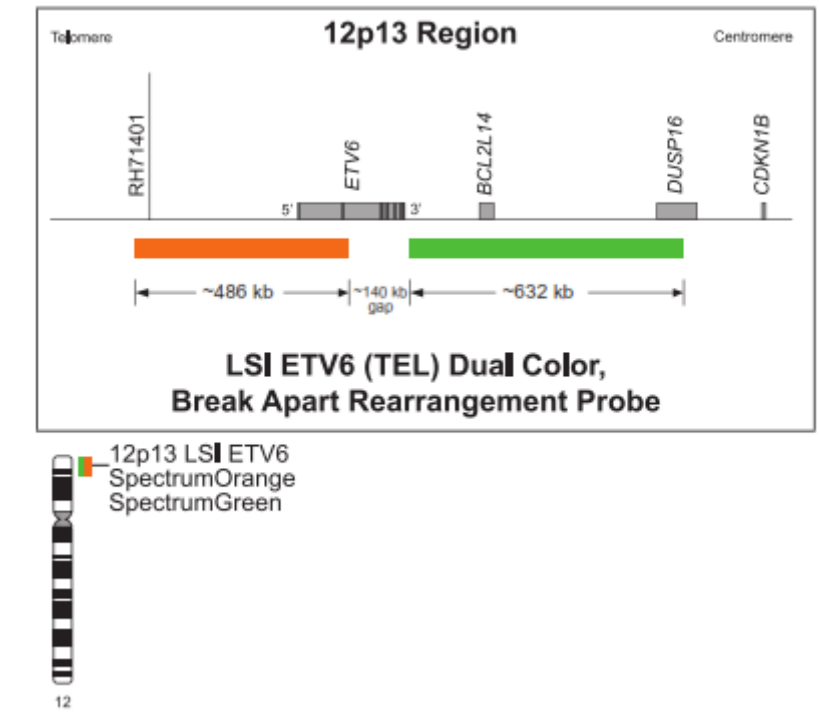
Описание процедуры и пояснения

Хромосомные перестройки (сбалансированные и несбалансированные транслокации и делеции) на участке 12p13 часто встречаются при лейкозе и миелодиспластическом синдроме[1] Подобные аберрации часто происходят с участием гена ETV6, который входит в состав семейства факторов транскрипции Ets. В транслокациях принимает участие не только ген ETV6, но и другие смежные гены.[1,2] Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI ETV6 используется для выявления аберраций на участке 12p13 при гемобластозах.[3,4]

Описание зонда

Зонд, меченный в SpectrumOrange, длиной около 486 килобаз расположен теломернее точки разрыва гена ETV6. Зонд, меченный в SpectrumGreen, длиной около 632 килобаз, расположен центромернее точки разрыва гена ETV6.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

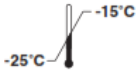


РЕАГЕНТЫ

1. Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI ETV6 (серия № 30-231034) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 400 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ



Vysis ETV6 Break Apart FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Набор Vysis ETV6 Break Apart FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis ETV6 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[12].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[8]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор

Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор

Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика
Необходимые материалы
- Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд LSI ETV6
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов
1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Настройка системы гибридизации/денатурации
Параметры
Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ограничения при использовании
Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[5]

Ожидаемые результаты
В нормальном ядре после гибридизации двухцветным разъединяющим перегруппировочным зондом наблюдается два оранжево-зеленых слитных сигнала (сигнал может быть желтым, частично или полностью). В ядре, где произошла перестройка с участием зоны точки разрыва гена ETV6 на участке 12p13, будет наблюдаться один оранжевый, один зеленый и один оранжево-зеленый (желтый) слитный сигнал. При наличии других патологических изменений могут появиться дополнительные виды сигналов. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих срезов, контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ошибочные результаты коденатурации
Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4XSSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте время гибридизации. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2XSSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2XSSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2XSSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что значения pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многополосные фильтры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза) (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Обрабатывайте такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые температуру и временные промежутки в соответствии с методикой анализа из данной инструкции.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи герметика, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH–метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многопропускные фильтры дают меньше света, чем однопропускные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многопропускных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		растворов (номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bohlander SK. ETV6: A versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(3):162-174.
2. Odero MD, Carlson K, Calasanz MJ, et al. Identification of New Translocations Involving ETV6 in Hematologic Malignancies by Fluorescence In Situ Hybridization and Spectral Karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;31(2):134-142.
3. Schwindt H, Vater I, Kreuz M, et al. Chromosomal imbalances and partial uniparental disomies in primary central nervous system lymphoma. *Leukemia*. 2009. [Epub ahead of print]
4. Park J, Kim M, Lim J, et al. Three-way complex translocations in infant acute myeloid leukemia with t(7;12)(q36;p13): the incidence and correlation of a HLXB9 overexpression. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;191(2):102-105.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. 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, PA 19087-1898 USA.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.
Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены.

www. abbottmolecular.com
Апрель 2020
30-608466/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis 1p36/1q25 and 19q13/19p13 FISH Probe Kit

en

REF 04N60-020

30-608438/R6

Vysis 1p36/1q25 and
19q13/19p13
FISH Probe Kit
REF 04N60-020
30-608438/R6

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±5°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Название

Vysis 1p36/1q25 и 19q13/19p13 FISH Probe Kit

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления делеций участков 1p36 и 19q13.

Описание процедуры и пояснения

По гистологической картине диффузные глиомы делятся на астроцитомы, олигодендроглиомы и олигоастроцитомы. Результаты флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием LSI зондов 1p36 и 19q13 свидетельствуют о том, что при олигодендроглиомах наблюдается делеция 1p, а аллельная потеря 1p является достоверным прогностическим фактором эффективности химиотерапии. Комбинированная делеция 1p36 и 19q13 часто наблюдается при классической гистологической картине олигодендроглиомы и соответствует большей продолжительности жизни.[1-5]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

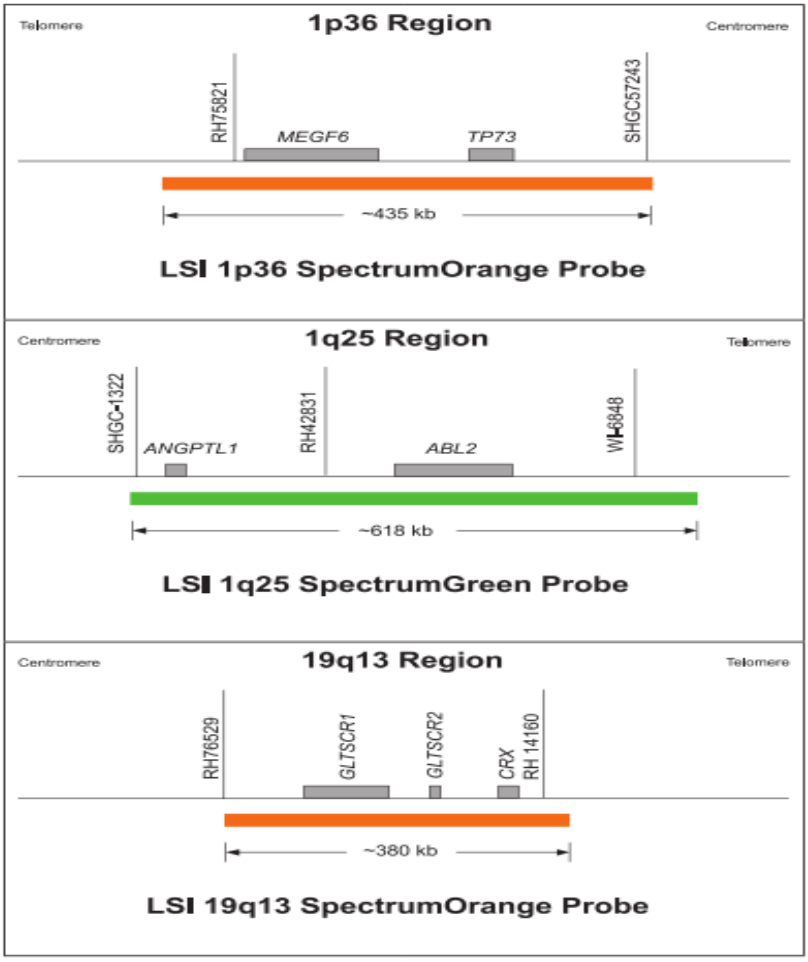
В нескольких исследованиях зонды Vysis LSI 1p36/1q25 и 19q13/19p13 использовались для выявления делеций на участках 1p36 и 19q13.[6-9] С помощью FISH Были изучены образцы опухолей 81 пациента с гистологически подтвержденным диагнозом глиомы от I до IV степени злокачественности по классификации ВОЗ. Полученные результаты подтверждают предыдущие данные, согласно которым делеция 1p36 и 19q13 характерна для олигодендроглиом.[6] Wharton и др. обнаружили 1p и 19q в подавляющем большинстве образцов олигодендроглиом II и III степени злокачественности по классификации ВОЗ.[7]

Результаты представленных выше и других исследований свидетельствуют о том, что FISH с использованием зондов LSI 1p36/LSI 19q13 позволяет дополнить морфологический диагноз и говорить о наличии признаков олигодендроглиомы.

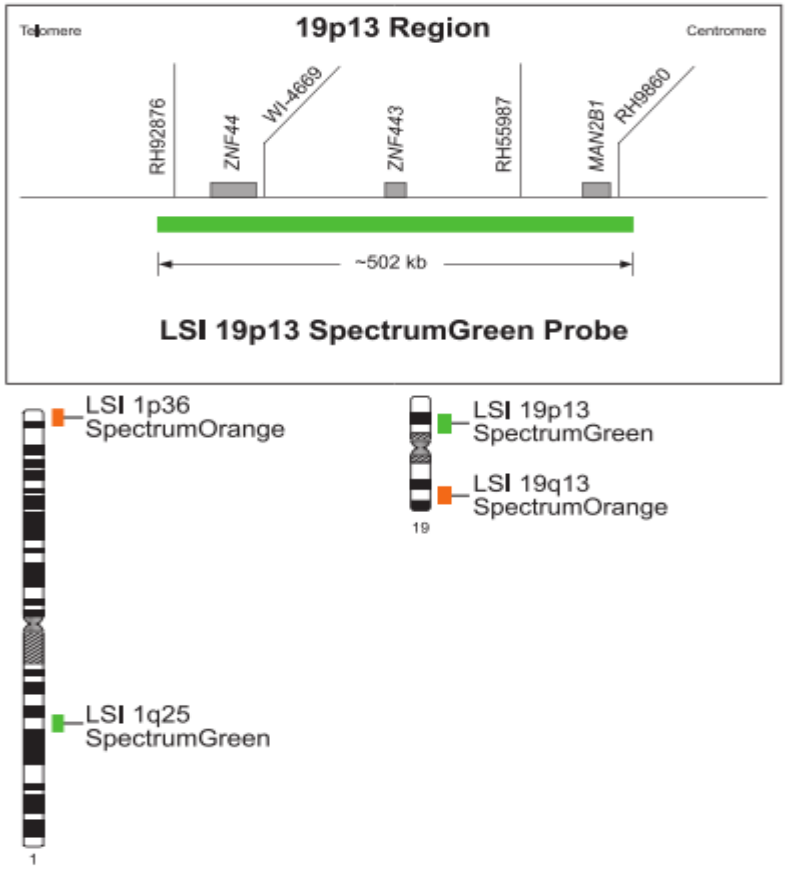
Описание зонда

Смесь зондов Vysis LSI 1p36 SpectrumOrange (~435 килобаз) и Vysis LSI 1q25 SpectrumGreen (~618 килобаз) находится в гибридизационном буферном растворе. Зонд LSI 1p36 содержит последовательности, которые начинаются рядом с локусом SHGC 57243, захватывают гены TP73 и MEGF6 и заканчиваются теломернее локуса MEGF6. Зонд LSI 1q25 содержит последовательности, которые начинаются теломернее гена ABL2, захватывают гены ABL2 и ANGPTL1 и заканчиваются проксимальнее локуса SHGC-1322.

Смесь зондов Vysis LSI 19q13 SpectrumOrange (~380 килобаз) и Vysis LSI 19p13 SpectrumGreen (~502 килобазы) находится в гибридизационном буферном растворе. Зонд LSI 19p13 содержит последовательности, которые начинаются центромернее локуса MAN2B1, захватывают гены MAN2B1, ZNF443 и ZNF44 и заканчиваются теломернее локуса ZNF44. Зонд LSI 19q13 содержит последовательности, которые начинаются теломернее локуса CRX, захватывают гены CRX, GLTSCR2 и GLTSCR1 и заканчиваются центромернее локуса GLTSCR1.



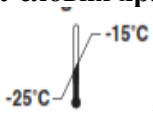
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



Реагенты

1. **Зонды Vysis LSI 1p36 SpectrumOrange/1q25 SpectrumGreen (серия № 30-231004)**
(1 флакон, 200 мкл/флакон). 55 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).
2. **Зонды Vysis LSI 19q13 SpectrumOrange/19p13 SpectrumGreen (серия № 30-231003)**
(1 флакон, 200 мкл/флакон). 60 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Набор зондов Vysis 1p36/1q25 и 19q13/19p13 для FISH следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Условия транспортировки

Во время транспортировки набор зондов Vysis 1p36/1q25 и 19q13/19p13 для FISH обкладывают сухим льдом.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI 1p36 SpectrumOrange/1q25 SpectrumGreen Probe

Vysis LSI 19q13 SpectrumOrange/19q13 SpectrumGreen Probe

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[11], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[12], CLSI документ M29-A3[13], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[14].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[8].
Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[11]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки:

• Формамид.

Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)

В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

2X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания

Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше -20°C (+5°C) и беречь от света.
Разрушение: под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)

- Зонды Vysis LSI 1p36 SpectrumOrange/1q25 SpectrumGreen
- Зонды Vysis LSI 19q13 SpectrumOrange/19p13 SpectrumGreen

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипетка (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).
1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация
Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (± 1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[10].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ожидаемые результаты

В интерфазных ядрах нормальных клеток, гибридизированных зондами LSI 1p36 и LSI 1q25, будут наблюдаться два оранжевых и два зеленых сигнала (2O2G), что свидетельствует о наличии двух интактных копий 1-ой хромосомы. При наличии делеции участка 1p36 оранжевых сигналов будет меньше.

В интерфазных ядрах нормальных клеток, гибридизированных зондами LSI 19q13 и LSI 19p13, будут наблюдаться два оранжевых и два зеленых сигнала, что свидетельствует о наличии двух интактных копий 19-ой хромосомы. При наличии делеции участка 19q13 оранжевых сигналов будет меньше.

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[10].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

совместной денатурации.

- При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	недостаточно высушены.	этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий	Убедитесь в том, что промывочные

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	промывочный раствор.	растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(19):1473-1479.
2. Smith JS, Alderete B, Minn Y, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*. 1999;18(28):4144-4152.
3. Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, et al. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: Implications for patient management
at diagnosis. *Clin Cancer Res.* 2001;7(4):839-845.
4. Perry A, Fuller CE, Banerjee R, et al. Ancillary FISH analysis for 1p and 19q status: Preliminary observations in 287 gliomas and oligodendroglioma mimics. *Front Biosci.* 2003;8:1-9.
5. Buckner JC, Gesme D Jr, O'Fallon JR, et al. Phase II trial of procarbazine, lomustine, and vincristine as initial therapy for patients with low-grade oligodendroglioma or oligoastrocytoma: Efficacy and associations with chromomosomal abnormalities. *J Clin Oncol.* 2003;21(2):251-255.
6. Kramar F, Zemanova Z, Michalova K, et al. Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J Neurooncol.* 2007;84(2):201-211.
7. Wharton SB, Maltby E, Jellinek DA, et al. Subtypes of oligodendroglioma defined by 1p,19q deletions, differ in the proportion of apoptotic cells but not in replication-licensed nonproliferating cells. *Acta Neuropathol.* 2007;113(2):119-127.
8. Takeuchi H, Kubota T, Kitai R, et al. Chromosome 1p and 19q deletions in malignant glioneuronal tumors with oligodendrogliomalike component. *J Neurooncol.* 2009;91(1):33-38.
9. Belaud-Rotureau MA, Meunier N, Eimer S, et al. Automatized assessment of 1p36-19q13 status in gliomas by interphase FISH assay on touch imprints of frozen tumors. *Acta Neuropathol.* 2006;111(3):255-263.
10. 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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis 1p36/1q25 и 19q13/19p13 FISH Probe Kit или двухцветных разъединяющих зондов Vysis LSI осуществляется на основании европейского патента № 5,663,319 и 5, 663, 319 и 5, 491б 224 приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента № 0 444 115 B1, приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange и HYBrite являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

CE

EC REP
ABBOTT
Max Plank-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2009, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июнь 2020 г.
30-608438/R6

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis CDKN2A/CEP 9 FISH Probe Kit

en

REF 04N61-020

30-608439/R3

Vysis CDKN2A/CEP 9
FISH Probe Kit
REF 04N61-020
30-608439/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления делеций CDKN2A (p16) на участке 9p21.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ И ПОЯСНЕНИЕ

Патологические изменения локуса 9p21, в т.ч. гена-супрессора опухолевого роста CDKN2A (p16), встречаются при различных менингиомах и глиомах.[1-4] Результаты исследований подтверждают взаимосвязь гомозиготной делеции CDKN2A с прогрессированием злокачественного процесса, а также свидетельствуют о том, что гомозиготная делеция является маркером неблагоприятного прогноза при анапластической олигодендроглиоме.[5-6]

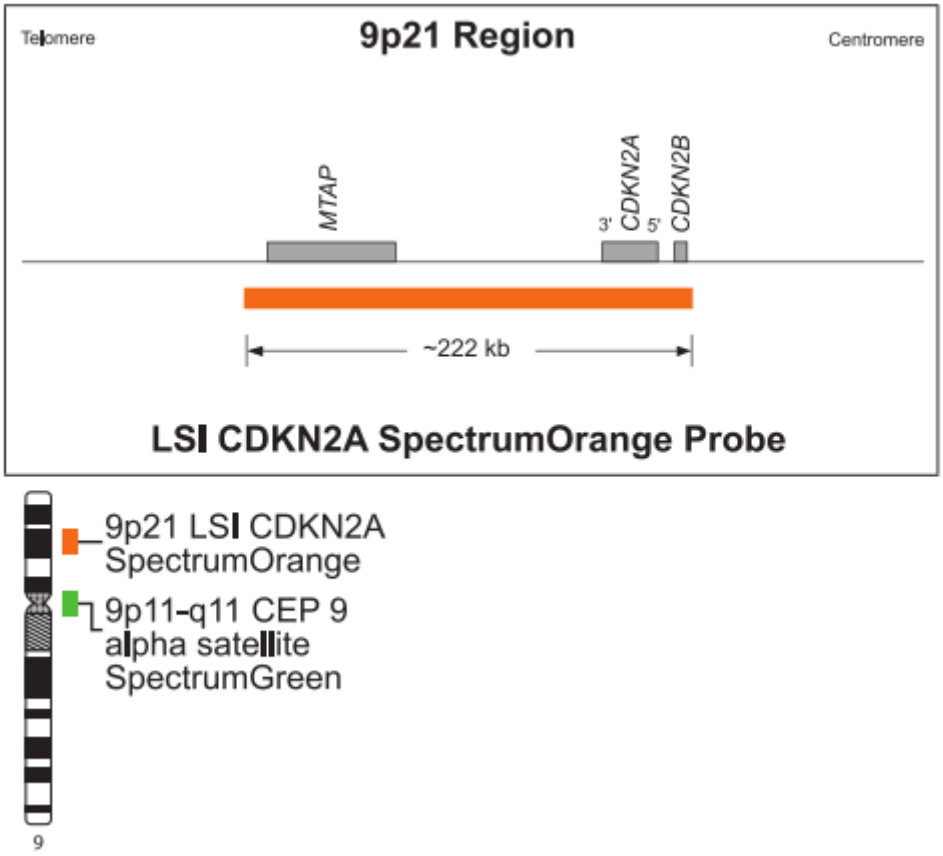
В нескольких цитогенетических исследованиях зонды Vysis LSI CDKN2A SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumGreen использовались для выявления делеции гена CDKN2A.[2,7-9] С помощью данного набора и других значимых маркеров (например, зондов Vysis p53, RB1, 1p36, 19q13 для FISH) Kramar и др. изучили 82 образца ткани 81 пациента с гистологически подтвержденной глиальной опухолью.[7] С помощью зондов Vysis LSI CDKN2A SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumGreen Korshunov

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

и др. изучили образцы тканей 189 пациентов моложе 50 лет с подтвержденной глиобластомой и обнаружили, что делеция 9p21 является прогностическим фактором неблагоприятного прогноза.[9]

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

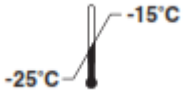
Смесь зондов состоит из зонда LSI CDKN2A (p16), меченного в SpectrumOrange, и зонда CEP 9, меченного в SpectrumGreen. Зонда LSI CDKN2A длиной около 222 килобаз содержит несколько генетических локусов, в т.ч. D9S1749, DS1747, p16 (INK4B), p14 (ARF), D9S1748, p15(INK4B) и D9S1752. Зонд CEP 9 SpectrumGreen гибридизирует на альфа-сателлитные последовательности, специфичные для 9-ой хромосомы.



РЕАГЕНТЫ

1. **Зонды Vysis LSI CDKN2A SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumGreen (серия № 30-190078)**
(1 флакон, 20 мкл/флакон). 150 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ



The Vysis LSI CDKN2A/CEP 9 Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки Vysis LSI CDKN2A/CEP 9 FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Только для диагностического использования *In Vitro*.
Vysis LSI CDKN2A SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[11], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[12], CLSI документ M29-A3[13], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[14].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа
Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани должны быть помещены на слайды с использованием стандартных процедур. Для подготовки заключенных в парафин образцов для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимизации проницаемости тканей и гибридизации с помощью стандартных процедур.

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI CDKN2A SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumGreen
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Столик для нагрева стекол с препаратами

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.

- Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
- Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более 4 стекол в сосуды Коплина одновременно.

- Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH**. ПРИМЕЧАНИЕ:** Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подержите препараты в 100% этаноле, пока все препараты полностью н высохнут и нанесите пробу.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

    7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP

    1 мкл зонда

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы, когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов.

Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Процедура быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1– секунды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температура промывочных растворов 73±1ºC, прежде, чем промывать другие 4 слайда.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через интервал от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

- Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения микроскопических стекол с образцами, пробами и покровными стеклами на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, их удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
1 мкл очищенной H2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (± 1°C) для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа - или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл конткрасителя на целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.[10]

Ожидаемые результаты
В интерфазных ядрах нормальных клеток, содержащих две копии CDKN2A, будут наблюдаться два оранжевых и два зеленых сигнала (2O2G). При наличии делеции одной копии участка длиной 222 килобазы, покрываемого зондом LSI CDKN2A, будет наблюдаться один оранжевый и два зеленых сигнала (1O2G). Делеция обоих копий исследуемых участков приводит к появлению только двух зеленых сигналов (0O2G). Минимальные делеции, не затрагивающие весь исследуемый участок, выявить не удастся. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[10].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. **Подготовка слайдов для коденатурации** • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
	Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and itsrelatives. *Biochimic Biophys Acta.* 1998;1378(2):F115-F177.
2. Perry A, Banerjee R, Lohse CM, et al. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. *Brain Pathol.* 2002;12(2):183-190.
3. Bostrom J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, et al. Alterations of the tumor supressor genes CDKN2A (p16 INK4a) p14ARF, CDKN2B (p15),and CDKN2C (p18INK4c) in atypical and anaplastic meningiomas. *AmJ Pathol.* 2001;159(2):661-669.
4. Smith JS, Jenkins RB. Genetic alterations in adult diffuse glioma:occurrence, significance, and prognostic implications. *Front in Biosci.*2000;5:D213-D231.
5. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.*1998;90(19):1473-1479.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Bortolotto S, Chiado-Piat L, Cavalla P, et al. CDKN2A/p16 Inactivation in the prognosis of oligodendrogliomas. *Int J Cancer*. 2000;88(4):554-557.
7. Kramar F, Zemanova Z, Michalova K, et al. Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J Neurooncol*. 2007;84(2):201-211.
8. Rajaram V, Leuthardt EC, Singh PK, et al. 9p21 and 13q14 dosages in ependymomas. A clinicopathologic study of 101 cases. *Mod Pathol*. 2004;17(1):9-14.
9. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer*. 2005;104(4):825-832.
10. 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.
11. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
13. 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.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI CDKN2A/CEP FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, 977, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены

www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608439/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis PTEN/CEP 10 FISH Probe Kit

en

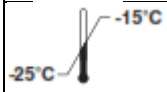
REF 04N62-020

30-608440/R3

Vysis PTEN/CEP 10
FISH Probe Kit
REF 04N62-020
30-608440/R3

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления делеции гена PTEN на участке 10q23.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ И ПОЯСНЕНИЯ

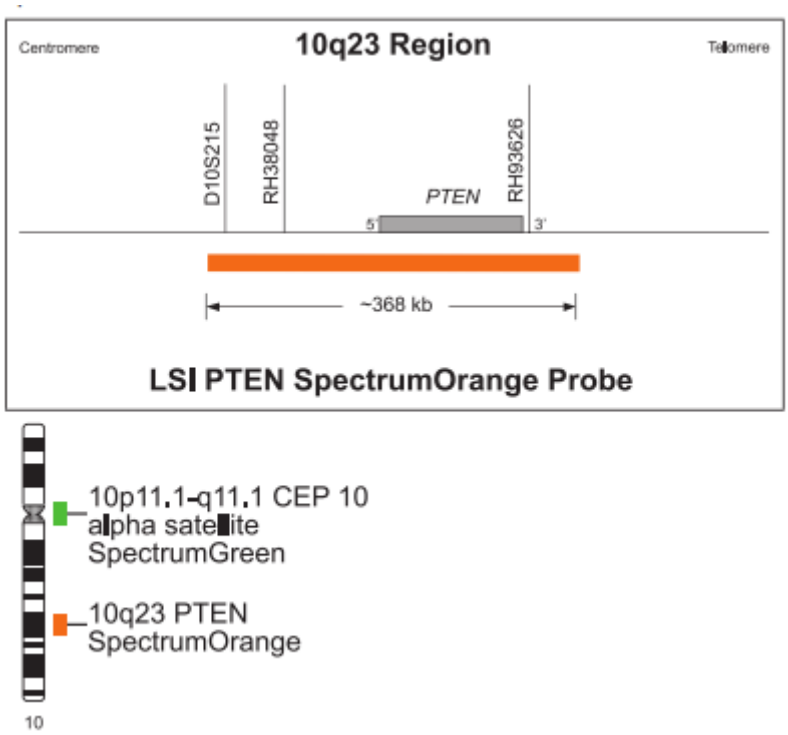
Мутации гена, кодирующего синтез фосфатазы и гомолога тензина, (гена PTEN) и расположенного на участке 10q23, и гена, кодирующего синтез белка p53, с одинаковой частотой встречаются при разных видах рака у человека.[1] Мутации гена-супрессора опухолевого роста PTEN встречаются при множественном раке, при котором наблюдается делеция 10q. Ген PTEN кодирует синтез липидной фосфазаты, которая подавляет метаболический путь, опосредованный фосфоинозитол-3-киназой/протеинкиназой B.[2] Чаще всего при глиомах встречается аллельная потеря 10q.[3]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В нескольких цитогенетических исследованиях зонды Vysis LSI PTEN SpectrumOrange/CEP 10 SpectrumGreen с успехом использовались для выявления делеции гена PTEN.[4-8] Данные, полученные при изучении образцов диффузной инфильтративной астроцитомы 159 пациентов, коррелировали с гистологической стадией заболевания. Клинические результаты исследования подтвердили целесообразность сочетания гистологического и молекулярного методов исследования.[4] Korshunov и др. использовали зонды Vysis PTEN SpectrumOrange/CEP 10 SpectrumGreen и зонды Vysis EGFR, CDKN2A, 1p/19q для FISH для изучения образцов низкодифференцированных мелкоклеточных глиом 114 пациентов с неясной морфологической картиной.[5] В другом исследовании зонды Vysis PTEN и EGFR для FISH использовались для изучения образцов 63 анапластических астроцитом и 111 мультиформных глиобластом (диагноз поставлен на основании данных биопсии). Результаты исследования подтверждают клиническую значимость обоих маркеров.[6]

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

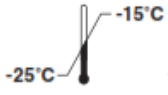
Смесь зондов состоит из зонда LSI PTEN (10q23), меченного в SpectrumOrange, и зонда CEP, меченного в SpectrumGreen. Зонд LSI PTEN (10q23) SpectrumOrange длиной около 368 килобаз гибридизирует участок 10q23 и содержит последовательность, которая располагается по обе стороны от гена PTEN на 5’ и 3’ концах. Зонд CEP 10 SpectrumGreen гибридизирует альфа сателлитные последовательности, специфичные для 10-ой хромосомы.



РЕАГЕНТЫ

1. **Зонды Vysis LSI PTEN SpectrumOrange/CEP 10 SpectrumGreen (серия № 30-231010)** (1 флакон, 20 мкл/флакон). 300 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)**
(1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Vysis PTEN/CEP 10 FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия транспортировки
Во время транспортировки **Vysis PTEN/CEP 10 FISH Probe Kit** транспортируется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Только для диагностического использования *In Vitro*.**
Vysis LSI PTEN SpectrumOrange/CEP 10 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[10], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[11], CLSI документ M29-A3[12], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[13].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[10]
Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI PTEN SpectrumOrange/CEP 10 SpectrumGreen
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Необходимые материалы (не в комплекте)
● 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
● 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
● Стеклянные сосуды Коплина
● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипетка (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фильтр Vysis... **Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**

DAPI/Orange флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[9].

Ожидаемые результаты
В интерфазных ядрах нормальных клеток, содержащих две интактные копии 10-ой хромосомы, будут наблюдаться два оранжевых и два зеленых сигнала (2O2G). При наличии делеции гена PTEN (10q23), оранжевых сигналов будет меньше. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[9].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Goberdhan DCI, Wilson C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum Mol Genet.* 2003;12(2):239-248.
2. Eng C. *PTEN*: One gene, many syndromes. *Hum Mutat.* 2003;22(3):183-198.
3. Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, et al. *PTEN* is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and *PTEN* alterations are associated with poor prognosis. *Am J Pathol.* 2001;159(1):359-367.
4. Mott RT, Turner KC, Bigner DD, et al. Utility of *EGFR* and *PTEN* numerical aberrations in the evaluation of diffusely infiltrating astrocytomas. *J Neurosurg.* 2008;108(2):330-335.
5. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: The utility of Fluorescence In situ hybridization. *Clin Cancer Res.* 2004;10(23):7820-7826.
6. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(16):1246-1256.
7. Pollack IF, Hamilton RL, James CD, et al. Rarity of *PTEN* deletions and *EGFR* amplification in malignant gliomas of childhood: results from the Children's Cancer Group 945 cohort. *J Neurosurg.* 2006;105(5 suppl):418-424.
8. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer.* 2005;104(4):825-832.
9. 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.
10. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
12. 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, PA 19087-1898 USA.
13. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.
CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июнь 2020
30-608440/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis EWSR1 Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 03N59-020

30-608248/R5

Vysis EWSR1 Break Apart FISH Probe Kit

REF 03N59-020

30-608246/R4

Изменения выделены

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления хромосомных перестроек с участием гена EWSR1, расположенного на участке 22q12.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ И ПОЯСНЕНИЕ

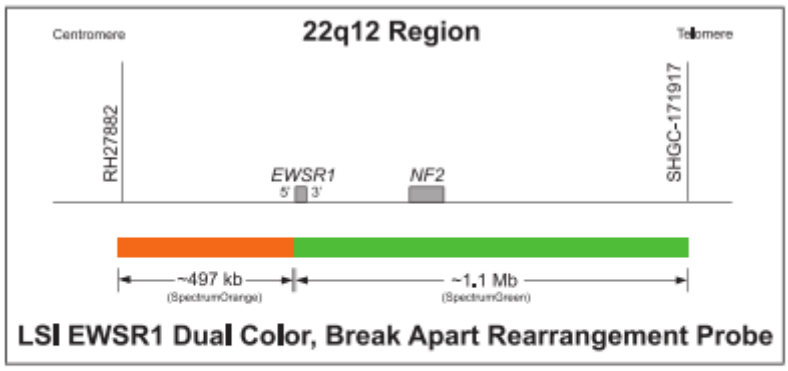
Хромосомные перестройки с участием гена EWSR1 (участка точки разрыва саркомы Юинга 1) встречаются при различных опухолях.[1] Около 90 % транслокаций с участием гена EWSR1 приводят к формированию t(11;22)(q24;q12), что приводит к слиянию генов EWSR1 и FLI1 (интеграции вируса лейкоза Френда 1) на участке 11q24 . В результате слияния образуются химерные транскрипты и белки, содержащие N-конец гена EWSR1 и C-конец гена FLI1[2]. Гибридизация разъединяющим перегруппировочным зондом LS EWSR1 (22q12) позволяет выявить перестройку на участке гена EWSR1, однако, определить специфический ген, участвующий в слиянии, не

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

удается. Кроме того, зонд позволяет выявить анеуплоидию 22-ой хромосомы. В нескольких исследованиях двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд LSI EWSR1 (22q12) использовался для выявления перестроек гена EWSR1. Согласно результатам серии исследований, зонд позволил выявить 90 % из 27 случаев саркомы Юинга/примитивной нейроэктодермальной опухоли (всего 67 случаев круглоклеточных опухолей); при этом не было ни одного ложноположительного результата. По сравнению с полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией в образцах, фиксированных в формалине и залитых парафином, метод имеет более высокую чувствительность и специфичность.[3] Patel и др. успешно использовали зонд для дифференциальной диагностики светлоклеточной саркомы мягких тканей от меланомы. Для светлоклеточных сарком характерна уникальная транслокация t(12;22)(q13;q12), приводящая к образованию белка EWS-ATF1.[4]

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд LSI EWSR1 (22q12) состоит из двух ДНК-зондов для FISH. Первый зонд длиной около 500 килобаз, маркированный в SpectrumOrange, располагается на 5’ стороне гена EWSR1 и продолжается к интрону 4. Второй зонд длиной 1 100 килобаз, маркированный в SpectrumGreen, располагается на 3’ стороне гена EWSR1. Точки разрыва гена EWSR1 находятся в интронах 7–10.

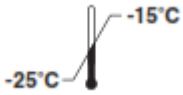


РЕАГЕНТЫ

1. Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI EWSR1 (22q12) (серия № 30-190059) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 350 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению



The Vysis EWSR1 Break Apart FISH Probe Kit должны храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки Vysis EWSR1 Break Apart FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Только для диагностического использования *In Vitro*.

Vysis LSI MYC SpectrumOrange Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[10]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[13].

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки:

• Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI EWSR1 (22q12)
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Пипетка (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).
1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[5], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ожидаемые результаты
Предполагается, что гибридизация нормальных интерфазных ядер с помощью двухцветного разъединяющего перегруппировочного зонда Vysis LSI EWSR1 (22q12) приведет к появлению двух сигналов слияния, отражающих две интактные копии EWSR1. В патологических ядрах с транслокацией t(22q12) или с другими простыми хромосомными перестройками одной копии участка гена EWSR1 будет наблюдаться один оранжевый, один зеленый сигнал и один сигнал слияния. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

соответствующих контролей и аналитических методов[5], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Sandberg AA & Bridge JA. Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Can Genet Cytogenet* 2000;123:1-26.

2. Arvand A & Denny CT. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001;20(40):5747-5754.

3. Bridge RS, Rajaram V, Dehner LP, et al. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of two FISH strategies and RT-PCR in malignant round cell tumors. *Modern Pathology* 2006;19:1-8.

4. Patel RM, Downs-Kelly E, Weiss SW, et al. Dual-color, break-apart fluorescence in situ hybridization for EWS gene rearrangement distinguishes clear cell sarcoma of soft tissue from malignant melanoma. *Modern Pathology* 2005;18:1585-1590.

5. 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.

6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition.
Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009. [Also available online: *Type* > www.cdc.gov, *search* > BMBL5 > *look up* sections III and IV.]

7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*

8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Техническая помощь:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange и HYBrite являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2007, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608248/R5

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis FOXO1 Break Apart FISH Probe Kit

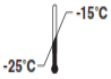
en

REF 03N60-020

30-608249/R4

Vysis FOXO1 Break Apart
FISH Probe Kit
REF 03N60-020
30-608249/R4

Обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления хромосомных перестроек с участием гена FOXO1 (FKH1, FKHR), расположенного на участке 13q14.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ И ПОЯСНЕНИЯ

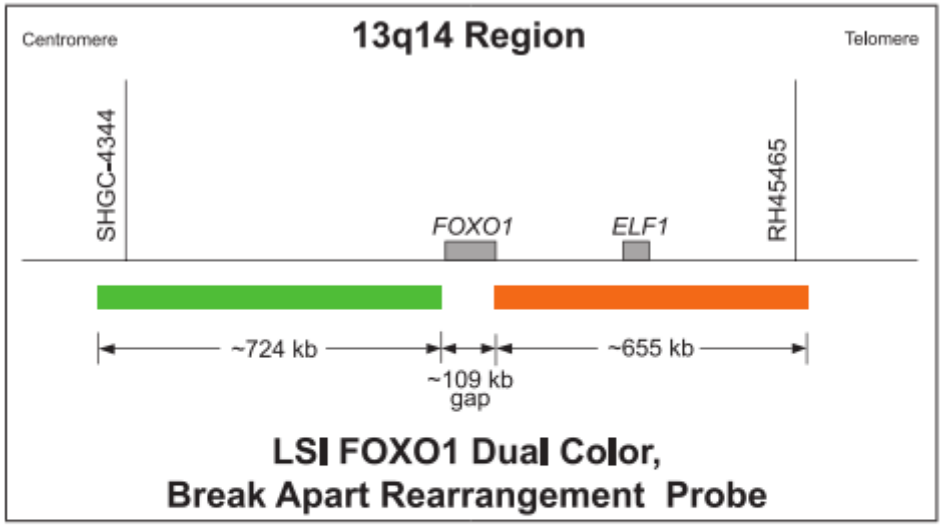
Хромосомные перестройки с участием гена FOXO1 на участке 13q14 встречаются при альвеолярной рабдомиосаркоме. Диагностика рабдомиосаркомы для патоморфологов представляет большую трудность, поскольку для проведения дифференциальной диагностики необходимо провести большое количество исследований. Для альвеолярной рабдомиосаркомы характерны две хромосомные транслокации: часто встречающаяся t(2;13)(q35.2;q14) и непостоянная t(1;13)(p36;q14). Транслокации приводят к слиянию генов PAX3 и FOXO1 и PAX7 и FOXO1 соответственно (~80 % случаев альвеолярной рабдомиосаркомы).[1-4] Гибридизация двухцветный разъединяющим перегруппировочным зондом Vysis LSI FOXO1 (13q14) позволяет выявить

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

хромосомную перестройку на участке гена FOXO1, однако, определить специфический ген, участвующий в слиянии, не удается.
В нескольких исследованиях данные разъединяющие зонды использовались для диагностики и определения прогноза альвеолярной рабдомиосаркомы.[5,6] Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI FOXO1 (13q14) позволил выявить перестройку гена FOXO1 в 12 из 13 (92,3 %) образцов альвеолярной рабдомиосаркомы, фиксированных в формалине и залитых парафином, и подтвердил морфологический и иммунофенотипический диагноз.[7] В другом исследовании зонд с успехом использовали для обнаружения хромосомных транслокаций, затрагивающих ген FOXO1, в жидком материале тонкоигольной аспирационной биопсии. С помощью исследования удалось подтвердить диагноз рецидивирующей альвеолярной рабдомиосаркомы.[8]

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI FOXO1 (13q14) состоит из двух ДНК-зондов для FISH. Первый зонд длиной около 720 килобаз, маркированный в SpectrumGreen, располагается проксимальнее гена FOXO1. Второй зонд длиной 650 килобаз, маркированный в SpectrumOrange, располагается дистальнее гена FOXO1. Теломерный зонд SpectrumOrange содержит ген ELF1.



РЕАГЕНТЫ

1. Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI FOXO1 (13q14) (серия № 30-231023) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 200 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Инструкции по хранению

The Vysis FOXO1 Break Apart FISH Probe Kit. Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Во время транспортировки Vysis FOXO1 Break Apart FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD Только для диагностического использования *In Vitro*.

Vysis LSI FOXO1 (13q14) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[10], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[11], CLSI документ M29-A3[12], и других соответствующих биобезопасности руководствах[13]. Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[10] Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.
20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа
Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани должны быть помещены на слайды с использованием стандартных процедур. Для подготовки заключенных в парафин образцов для FISH-методики, образцы должны быть депарафинизированы и предварительно обработаны для максимизации проницаемости тканей и гибридизации с помощью стандартных процедур.

ПРОЦЕДУРА
Необходимые материалы (в комплекте)
- Двухцветный разъединяющий перегруппировочный зонд Vysis LSI FOXO1 (13q14)
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1-10 мкл
- Микродозатор объемом 1-10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Столик для нагрева стекол с препаратами

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.

- Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
- Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более 4 стекол в сосуды Коплина одновременно.

- Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH**. ПРИМЕЧАНИЕ:** Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подержите препараты в 100% этаноле, пока все препараты полностью н высохнут и нанесите пробу.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
   7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
   1 мкл зонда
   2 мкл дистиллированной воды

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если препараты готовы, когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов.

Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Процедура быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1– секунды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что температура промывочных растворов 73±1ºC, прежде, чем промывать другие 4 слайда.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через интервал от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

- Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения микроскопических стекол с образцами, пробами и покровными стеклами на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, их удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
1 мкл очищенной H2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для системы гибридизации/денатурации HYBrite. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (± 1°C) для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа - или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл конткрасителя на целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[9], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ожидаемые результаты

Предполагается, что гибридизация нормальных интерфазных ядер с помощью двухцветного разъединяющего перегруппировочного зонда Vysis LSI FOXO1 (13q14) приведет к появлению двух сигналов слияния, отражающих две интактные копии FOXO1. В патологических ядрах с транслокацией t(13q14) или с другими простыми хромосомными перестройками одной копии участка гена FOXO1 будет наблюдаться один оранжевый, один зеленый сигнал и один сигнал слияния. В патологических ядрах часто появляются другие сигналы, свидетельствующие об анеуплоидии или полиплоидии. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[9], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. **Подготовка слайдов для коденатурации** • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Anderson J, Gordon T, McManus A, Mapp T, et al. Detection of the PAX3-FKHR fusion gene in paediatric rhabdomyosarcoma: a reproducible predictor of outcome? *Br J Cancer*.2001;85(6):831-835.
2. Biegel JA, Nycum LM, Valentine V, et al. Detection of the t(2;13) (q35;q14) PAX3-FKHR fusion in alveolar rhabdomyosarcoma by fluorescence in situ hybridization. *Gene Chrom Cancer*. 1995;12(3):186-192.
3. Slominski A, Wortsman J, Carlson A, et al. Molecular Pathology of Soft Tissue and Bone Tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123(1):1246-1259.
4. Womer RB. Paediatric Update, Soft Tissue Sarcomas. *Eur J of Cancer* 1997;33(13):2230-2236.
5. Nishio J, Althof PA, Bailey JM et al. Use of novel FISH assay on paraffin-embedded tissues as an adjunct to diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma. *Lab Invest* 2006;86:547-556.
6. Mehra S, de la Roza G, Tull J, et al. Detection of FOXO1 (FKHR) Gene Break-apart by Fluorescence In Situ Hybridization in Formalinfixed, Paraffin-embedded Alveolar Rhabdomyosarcomas and its Clinicopathologic Correlation. *Diagn Mol Pathol* 2008;17(1):14-20.
7. Matsumura T, Yamaguchi T, Seki K, et al. Advantage of FISH analysis using FKHR probes for an adjunct to diagnosis of rhabdomyosarcomas. *Virchows Arch* 2007 (Epub ahead of print).
8. Das K, Mirani N, Hameed M, et al. Fine-Needle Aspiration Cytology of Alveolar Rhabdomyosarcoma Utilizing ThinPrep Liquid-Based Sample and Cytospin Preparations: A Case Confirmed by FKHR Break Apart Rearrangement by FISH Probe. *Diagn Cytopath* 2006;34(10):704-706.
9. 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.
10. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
11. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
13. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI FOXO1 Break Apart FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular и американскими патентами 5, 491, 224. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, 977, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все остальные торговые марки являются собственностью их владельцев.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020. Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608249/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ZNF217 SpectrumGold FISH Probe Kit

en

REF 05N15-020

30-608471/R3

Vysis ZNF217 SpectrumGold
FISH Probe Kit
REF 05N15-020
30-608471/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления исследуемой последовательности ZNF217 на хромосоме 20q13.2.

Описание процедуры и пояснения

Ген ZNF217 является онкогеном, вероятно, играющим ключевую роль в опухолевой трансформации. ZNF217 расположен на хромосоме 20q13. Амплификация данного участка наблюдается при большом количестве опухолей.[1-6] Амплификация гена ZNF217 при раке молочной железы связана с более агрессивным опухолевым ростом и более серьезным прогнозом заболевания.[7]

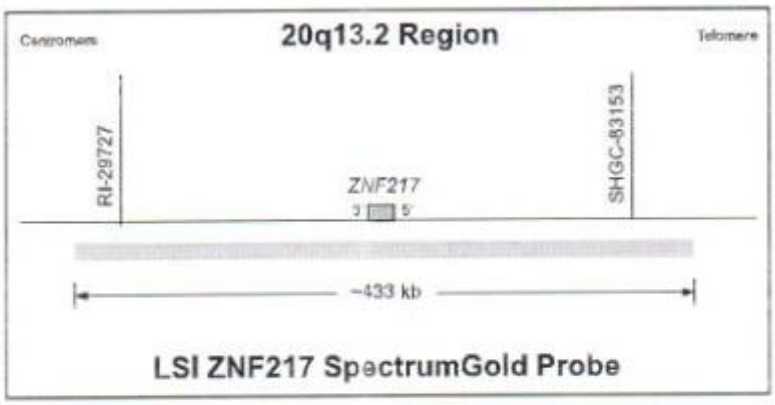
Vysis ZNF217 SpectrumGold был использован в исследовании по оценке достоверных различий в роли генов, амплифицирующихся при раке молочной железы и определения их роли в патогенезе рака грудной железы у мужчин. У 128 мужчин была проведена флуоресцентная гибридизация с использованием зонда Vysis ZNF217 SpectrumGold, а также других зондов Vysis LSI HER-2, LSI CCND1, LSI MYC и соответствующих центромерных зондов.[8] В другом исследовании с использованием зонда Vysis ZNF217 SpectrumGold было показано, что ген ZNF217 вносит

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

значительный вклад в развитие рака гортани. В ходе исследования был проведен анализ ткани 863 карцином гортани.[9]

Описание зонда ZNF217

Размер зонда Vysis ZNF217 SpectrumGold составляет около 433 килобаз, гибридизация зонда происходит на участке 20q13.2 хромосомы 20, содержащем ген ZNF217 размером около 16,1килобаз (chr20:51617017-51633114 Март 2006, Геномный браузер).

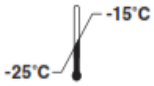


Реагенты

1.Зонды Vysis LSI ZNF217 SpectrumGold (серия № 30-231013) (1 флакон, 20 мкл/флакон).100 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ



Зонды Vysis ZNF217 SpectrumGold следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis ZNF217 SpectrumGold обкладывают сухим льдом.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI ZNF SpectrumGold Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

биомедицинских лабораториях[11], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[12], CLSI документ M29-A3[13], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[14].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[11]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[14]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI ZNF217 SpectrumGold
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипетка (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.
Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).
1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[10].

Ожидаемые результаты
В интерфазе ядро клетки в норме должно содержать две копии гена ZNF 217, при исследовании наблюдаются два золотых сигнала. Амплификация гена ZNF217 приведет к появлению более двух золотых сигналов. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.[10]

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Collins C, Rommens JM, Kowbel D, et al. Positional cloning of ZNF217 and NABCI: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8703-8708.
2. Yang SH, Seo MY, Jeong HJ, et al. Gene copy number change events at chromosome 20 and heir association with recurrence in gastric cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005;11(2 Pt 1):612620.
3. Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, et al. Genetic analysis of benign, low-grade, and highgrade ovarian tumors.*Cancer Res.* 1995;55(24):6172-6180.
4. Zhu H, Lam DC, Han KC, et al. High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumor genes in lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2007;245(1-2):303-314.
5. Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, et al. Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res.* 2002;62(23):6803-6807.
6. Lassmann S, Weis R, Markowiec F, et al. Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and timor suppressor genes in chromosomal-and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *J Mol Med.* 2007;85(3):293-304.
7. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, et al. Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clin Cancer Res.* 1995;1(12):1455-1461.
8. Barlund M, Kuukasjarvi T, Syrjakoski K, et al. Frequent amplification and overexpression of CCND1 in male breast cancer. *Int J Cancer.* 2004;111(6):968-971.
9. Koynova D, Tsenova V, Kunev K, et al. Tissue microarray study of ZNF217 copy number changes in Larynx Carcinoma. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2006;128-131.
10. 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.
11. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards. *Bloodborne Pathogens.*
13. 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, PA 19087-1898 USA.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608471/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis D20S108 FISH Probe Kit

en

REF 05N02-020

30-608441/R3

Vysis D20S108
FISH Probe Kit
REF 05N02-020
30-608441/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Зонд для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления делеций Vysis LSI D20S108 на участке 20q12.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ И ПОЯСНЕНИЯ

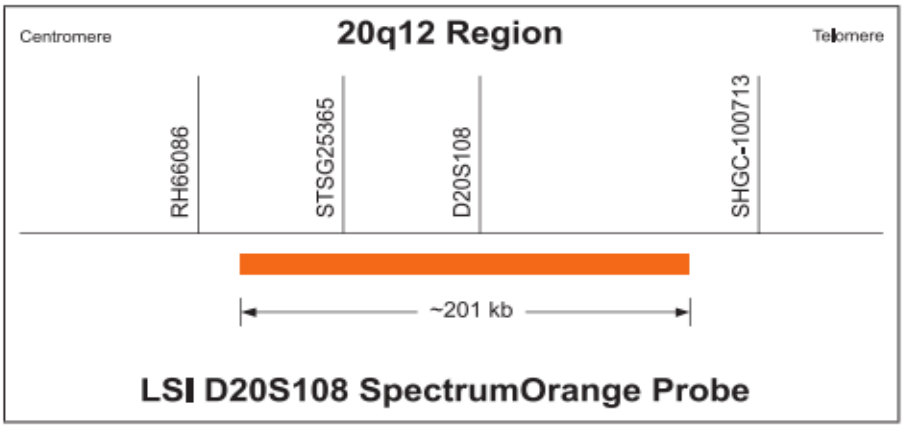
Приобретенные делеции длинного плеча 20-ой хромосомы встречаются примерно у 4 % пациентов с миелодиспластическим синдромом и у 1–2 % пациентов с острым миелоидным лейкозом и миелопролиферативными заболеваниями.[1] Результаты цитогенетического анализа свидетельствуют о том, что делеции имеют разную протяженность, но чаще всего локализуются на участке 20q11.2-q12. На этом участке располагается онкоген SRC и, возможно, другие гены-супрессоры опухолевого роста.[2,3] При миелопролиферативных заболеваниях длина участка составляет 2,7 мегабазы, при остром миелоидном лейкозе и миелодиспластическом синдроме – 2,6 мегабазы; длина перекрывающегося участка – 1,7 мегабазы.[3,4] Результаты статистических анализов исследования, в котором приняли участие 36 пациентов с миелопролиферативными заболеваниями, миелодиспластическим синдромом и острым миелоидном лейкозом и делецией на длинном плече 20-ой хромосомы свидетельствуют о том, что пациенты с изолированной цитогенетической аберрацией имеют благоприятный прогноз и живут дольше, чем пациенты с дополнительными

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

хромосомными перестройками.[1] С помощью FISH, в т.ч. зонда Vysis LSI D20S108 при исследовании 38 образцов тканей пациентов с миелодиспластическим синдромом, миелопролиферативными заболеваниями и сочетанной патологией Douet-Guilbert и др.[4] обнаружили один участок, на котором чаще всего происходят делеции.

ОПИСАНИЕ ЗОНДА

Зонд Vysis LSI D20S108 имеет длину около 201 килобазы, мечен в SpectrumOrange и содержит локус D20S108, расположенный на участке 20q12.



РЕАГЕНТЫ

1. **Зонды Vysis LSI D20S108 SpectrumOrange (серия № 30-190049)** (1 флакон, 20 мкл/флакон). 200 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.
2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ

Vysis LSI D20S108 FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Набор Vysis LSI D20S108 FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis LSI D20S108 SpectrumOrange Probe

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и других соответствующих биобезопасности руководствах[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[6]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI D20S108 SpectrumOrange
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Микропипетка-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата (образца-мишени)

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.**

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: **В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.**

Приготовление раствора зондов
1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºС приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºС) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºС.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°С для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°С на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºС минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºС.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/ гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):
7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Нни Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца-мишени и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[5]

Ожидаемые результаты

В ядрах нормальных клеток, гибридизированных набором зондов Vysis D20S108 для FISH, будут наблюдаться два оранжевых сигнала (2O). При наличии делеции гена D20S108 появится только один оранжевый сигнал. При наличии других патологических изменений могут появиться дополнительные виды сигналов. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.[5]

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4XSSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте время гибридизации. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4XSSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2XSSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2XSSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2XSSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2XSSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что значения pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многополосные фильтры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза) (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Обрабатывайте такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые температуру и временные промежутки в соответствии с методикой анализа из данной инструкции.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи герметика, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH–метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многопропускные фильтры дают меньше света, чем однопропускные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многопропускных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Brezinova J, Zemanova Z, Ransdorfova S, et al. Prognostic significance of del(20q) in patients with hematological malignancies. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;160(2):188-192.
2. Roulston D, Espinosa R 3rd, Stoffel M, et al 1993. Molecular genetics of myeloid leukemia: identification of the commonly deleted segment of chromosome 20. *Blood*. 1993;82(11):3424-3429.
3. Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, et al. Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG) *Oncogene*. 2000; 19(34):3902-3913.
4. Douet-Guilbert N, Basinko F, Morel F, et al. Chromosome 20 deletions in myelodysplastic syndromes and Philadelphiachromosome-negative myeloproliferative disorders: characterization by molecular cytogenetics of commonly deleted and retained regions. *Ann Hematol*. 2008;87(7):537-544.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. *Type*> www.cdc.gov, *search*>BMBL5>*look up* sections III and IV.]
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved\ Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.
CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.
Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608441/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis CSF1R/D5S23, D5S721 FISH Probe Kit

en

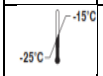
REF 05N03-020

30-608442/R3

Vysis CSF1R/D5S23, D5S721
FISH Probe Kit
REF 05N03-020
30-608442/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Зонды для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначены для выявления делеции исследуемой последовательности зонда LSI CSF1R на участке хромосомы 5q33-q34.

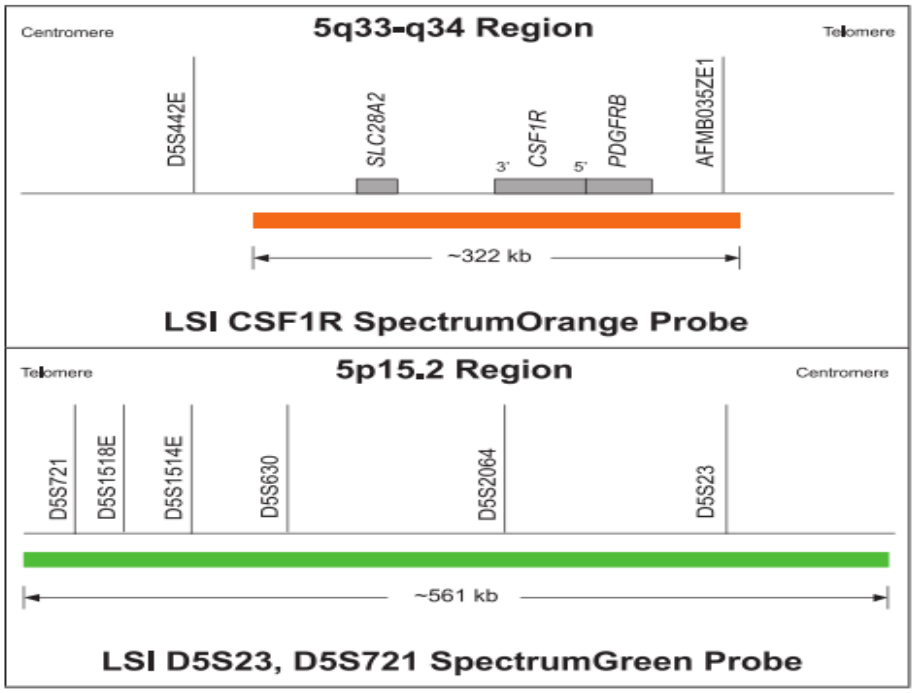
Описание процедуры и пояснения

Обычно характерные участки делеции определяются на хромосоме 5q при гемобластозах с помощью FISH и других методов.[1] Делеция участка размером 1,5 мегабаз, содержащего ген CSF1R характерна для 5q синдрома, подтипа миелодиспластического синдрома.[2] Отсутствие сигнала гибридизации от одной из копий зонда LSI CSF1R является признаком наличия делеции характерного участка при 5q синдроме. Двухцветные зонды Vysis LSI CSF1R/D5S23, D5S721 использовались в нескольких исследованиях для установления делеции LSI CSF1R.[2,4]

Описание зонда

Набор двухцветных зондов Vysis LSI CSF1R/D5S23, D5S721 является смесью зонда CSF1R SpectrumOrange около 322 килобаз и зонда SpectrumGreen D5S23, D5S721 около 561 килобаз.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

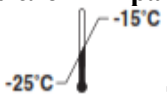


РЕАГЕНТЫ

1. Зонды Vysis LSI CSF1R SpectrumOrange/D5S23, D5S721 зонд SpectrumGreen (серия № 30-191001) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 350 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Зонд Vysis CSF1R/D5S23, D5S721 FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis LSI CSF1R/D5S23, D5S721 FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**
Медицинское оборудование для диагностики in vitro
Vysis LSI LSI CSF1R SpectrumOrange/D5S23, D5S721 зонд SpectrumGreen Probes

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[6].
Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[9].

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонд Vysis LSI CBFB Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.
Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.
Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[6].

Ожидаемые результаты
Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью набора зондов CSF1R/D5S23, D5S721 FISH приведет к появлению двух оранжевых и двух зеленых сигналов (2O2G). В ядре,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

содержащем делецию локуса CSF1R, будет наблюдаться один оранжевый и два зеленых сигнала(1O2G). При изучении других патологических образцов можно получить другие результаты. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[5].

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. **Подготовка слайдов для коденатурации** • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºС в течение 3 недель.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Kelaidi C, Eclache V, Fenaux P. The role of lenalidomide in the management of myelodysplasia with del 5q. *Br J Haematol*. 2008;140(3):267-278.
2. Boultwood J, Fidler C, Strickson AJ, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q-syndrome. *Blood*. 2002;99(12):4638-4641.
3. Bram S, Swolin B, Rodjer S, et al. Is monosomy 5 an uncommon aberration? *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;142(2):107-114.
4. Herry A, Douet-Guilbert N, Morel F, et al. Redefining monosomy 5 by molecular cytogenetics in 23 patients with MDS/AML. *Eur J Haematol*. 2007;78(6):457-467.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. 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.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI CSF1R/D5S23, D5S721 FISH Probe Kit и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента 5, 663, 319, и патентами 5, 491, 224, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929, приписанного[1]Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2009, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608442/R3

Abbott

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit

en

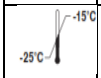
REF 05N07-020

30-608464/R4

Vysis D7S486/CEP 7
FISH Probe Kit
REF 05N07-020
30-608464/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±5°C)
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации Vysis D7S486/CEP7 (FISH) предназначен для выявления исследуемой последовательности зонда LSI D7S486 и CEF 7 на участке хромосомы 7q31 и 7p11.1-q11.1 соответственно.

Описание процедуры и пояснения

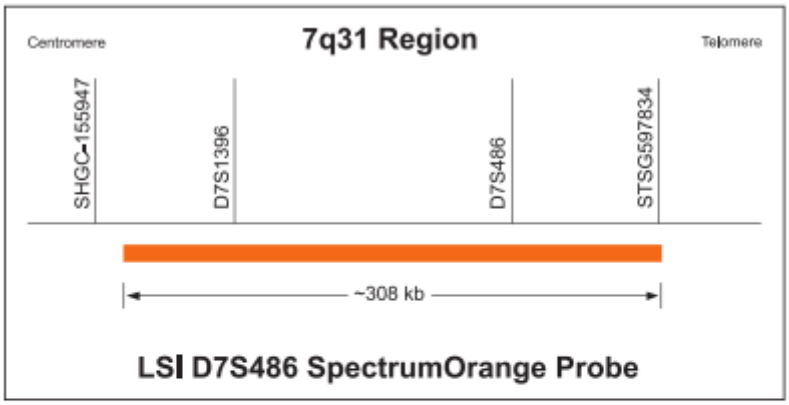
Моносомия по хромосоме 7 и отсутствие хромосомы 7q наблюдается при некоторых гемобластозах, таких как миелодиспластический синдром (MDS)и острый миелоидный лейкоз (AML). В некоторых случаях данные изменения могут оказывать влияние на прогноз пациента.[1,2] Зонды Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen используются для выявления изменения количества копий LSI D7S486 и CEP 7 при остром миелоидном лейкозе и миелодиспластическом синдроме.[2,4]

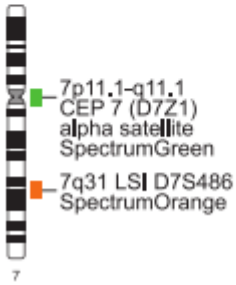
Описание зондов D7S486/CEP 7

Зонды Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen - это смесь зонда D7S486 SpectrumOrange(7q31) и CEP 7 SpectrumGreen (7p11.1-q11.1). Размер зонда LSI D7S486 составляет около 308 килобаз (хромосома 7:115462602-115770704; март 2006 UCSC Human Genome Browser).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Зонд CEP 7 направлен на выявление альфа-сателлитной последовательности центромеры хромосомы 7.



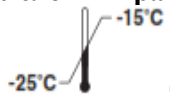


Реагенты

1.Зонды Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP7 SpectrumGreen (серия № 30-191002) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 300 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Зонд Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Vysis LSI LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP7 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[6].
Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[9].

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид ультравысокой очистки
- Контрастирующий краситель DAPI II
- Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец
ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Для каждой лаборатории должны быть разработаны критерии проверки изменений при проведении теста.
Если при анализе наблюдаются нарушения, следует тщательно пересмотреть полученный результат, используя одиночный фильтр.
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[5].

Ожидаемые результаты

Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью зонда LSI D7S486/CEP 7 приведет к появлению двух оранжевых и двух зеленых сигналов. При наличии делеции будет наблюдаться один оранжевый и два зеленых сигнала. При моносомии будет наблюдаться один оранжевый и один зеленый сигнал. При исследованиях могут быть получены другие результаты. В таких случаях для интерпретации следует применять метафазный анализ.[5]

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.** • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. **Подготовка слайдов для коденатурации** • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
		Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 –50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, et al. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2007;137(3):193-205.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002;100(13):4325-4336.
3. Cherry AM, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res*. 2003;27(12):1085-1090.
4. Vance GH, Kim H, Hicks GA, et al. Utility of interphase FISH to stratify patients into cytogenetic risk categories at diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) clinical trial (E1900) *Leuk Res*. 2007;31(5):605-609.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента 5, 491, 224, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.). Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, и 6, 607, 877, приписанного[1]Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608464/R4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ZNF217 SpectrumRed FISH Probe Kit

en

REF 05N16-010

30-608470/R3

Vysis ZNF217 SpectrumRed
FISH Probe Kit
REF 05N16-010
30-608470/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения количества копий ZNF217 хромосомы 20q13.2.

Краткое описание и разъяснение

Ген ZNF217 является кандидатным онкогеном, который, как предполагается, играет ключевую роль в злокачественной трансформации. ZNF217 локализован в 20q13, области, которая часто амплифицируется при множестве типов ЗНО.[1-6] Амплификация ZNF217 при раке молочной железы ассоциирована с агрессивным течением и плохим клиническим прогнозом.[7]

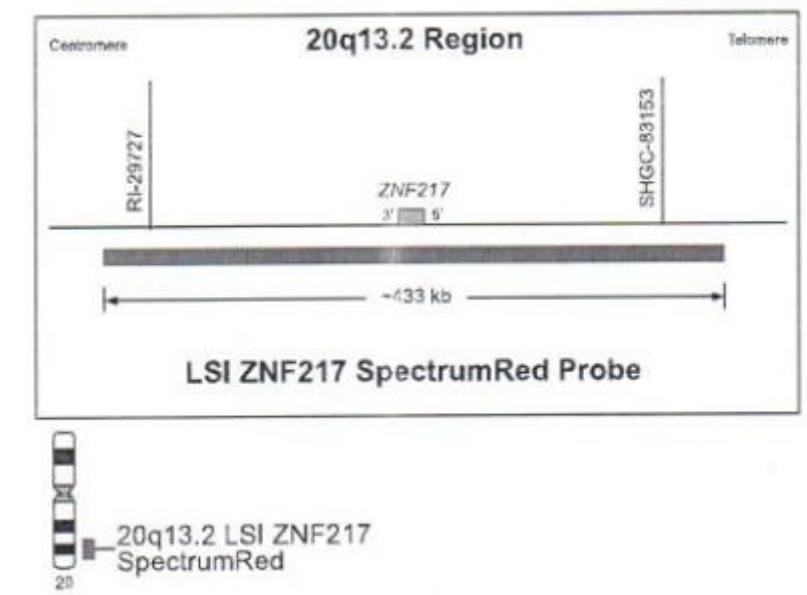
Проба Vysis LSI ZNF217 SpectrumOrange была использована в исследовании, которое выявило значительные различия в роли генов, известных как амплифицируемые при раке молочной железы, и их значимости для патогенеза рака молочной железы у мужчин. Флуоресцентная гибридизация in situ была проведена в 128 случаев рака молочной железы у мужчин с использованием пробы Vysis LSI ZNF217 SpectrumOrange в добавок к другим пробам Vysis, включая LSI HER-2, LSI CCND1, LSI MYC, и соответствующие центромерные пробы.[8]

В другом исследовании проба Vysis LSI ZNF217 SpectrumOrange была использована для определения прироста ZNF217 как важной аномалии и прогностического фактора в патогенезе рака

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

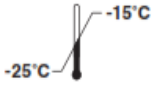
гортани. Для этого исследования была проанализирована тканевая микропанель из 863 карцином гортани.[9]

Описание пробы
Проба Vysis LSI ZNF217 SpectrumRed является единичной пробой последовательности в 433 килобаз, напрямую маркированной SpectrumRed, которая гибридизируется с областью 20q13.2 хромосомы 20 и включает ген 17.5 kb ZNF217.



Реагенты
1. **Проба Vysis LSI ZNF217 SpectrumRed (Часть номер. 30-231063)** (1 пробирка, 10 мкл/пробирку). 200 нг/мкл. Флуорофор-маркированная проба ДНК и блокирующий ДНК в трис-ЭДТА буфер.
2. **Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации (Часть номер. 30-804826)** (1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ



Зонды Vysis ZNF217 SpectrumRed следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света

Инструкции по транспортировке
Транспортировка пробы Vysis ZNF217 SpectrumRed FISH осуществляется в сухом льду.
Если вы получили реагенты, состояние которых не соответствует состоянию, описанному в инструкции, или поврежденные реагенты, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**
Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis LSI ZNF SpectrumRed Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[11], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[12], CLSI документ M29-A3[13], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[14].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[11]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[14]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Приготовление микропрепаратов из образцов ткани, фиксированных в формалине и залитых в парафин, проводится в соответствии со стандартными процедурами.

Для увеличения проницаемости и подготовки к гибридизации перед FISH залитые в парафин образцы необходимо депарафинизировать и обработать, используя стандартные процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI ZNF217 SpectrumRed
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипетка (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид ультравысокой очистки
- Контрастирующий краситель DAPI II
- Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).
1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[10].

Ожидаемые результаты
В ядрах нормальных клеток в интерфазе содержится 2 копии ZNF217, наблюдаются 2 красных сигнала (2R). В клетках с амплификацией гена ZNF217, будут наблюдаться более 2 копий красного сигнала. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических техник, наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования.[10]

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºС). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Collins C, Rommens JM, Kowbel D, et al. Positional cloning of ZNF217 and NABCI: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(15):8703-8708.
2. Yang SH, Seo MY, Jeong HJ, et al. Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients. Clin Cancer Res. 2005;11(2 Pt 1):612-620.
3. Iwabuchi H, Sakamoto M, Sakunaga H, et al. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. Cancer Res. 1995;55(24):6172-6180.
4. Zhu H, Lam DC, Han KC, et al. High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumor genes in lung cancer cell lines. Cancer Lett. 2007;245(1-2):303-314.
5. Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, et al. Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. Cancer Res. 2002;62(23):6803-6807.
6. Lassmann S, Weis R, Markowiec F, et al. Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and timor suppressor genes in chromosomal-and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. J Mol Med. 2007;85(3):293-304.
7. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, et al. Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. Clin Cancer Res. 1995;1(12):1455-1461.
8. Bärlund M, Kuukasjärvi T, Syrjäkoski K, et al. Frequent amplification and overexpression of CCND1 in male breast cancer. Int J Cancer. 2004;111(6):968-971.
9. Koynova D, Tsenova V, Kunev K, et al. Tissue microarray study of ZNF217 copy number changes in Larynx Carcinoma. Biotechnol Biotechnol Equip. 2006;128-131.
10. 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.
11.US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
12.US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards. *Bloodborne Pathogens.*
13.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, PA 19087-1898 USA.
14.World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization; 2004.

Техническая поддержка:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608470/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ATM/CEP 11 FISH Probe Kit

en

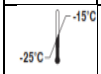
REF 05N55-020

30-608293/R3

Vysis ATM/CEP 11
FISH Probe Kit
REF 05N55-020
30-608293/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Зонд Vysis ATM/CEP 11 для FISH методики (набор реактивов) предназначен для выявления числа повторов в участке связывания зонда LSI ATM, локализованных в хромосоме 11q22.3.

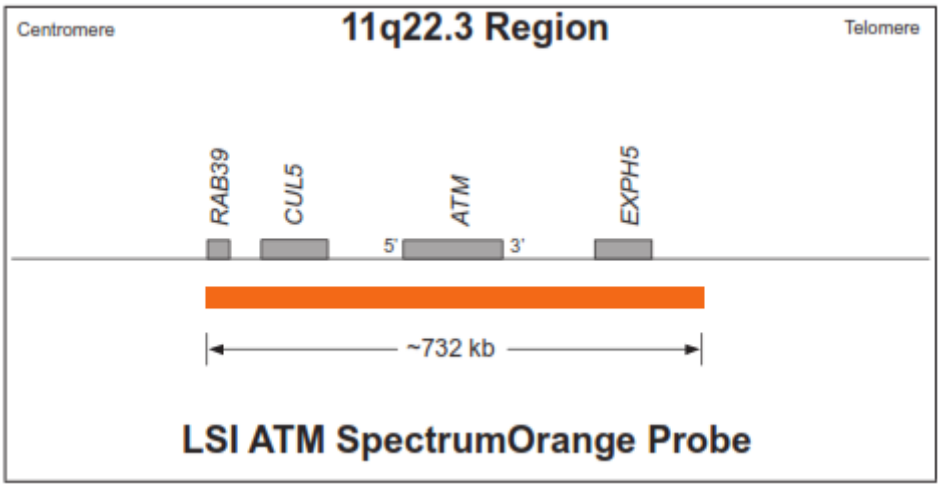
Краткое описание и разъяснения

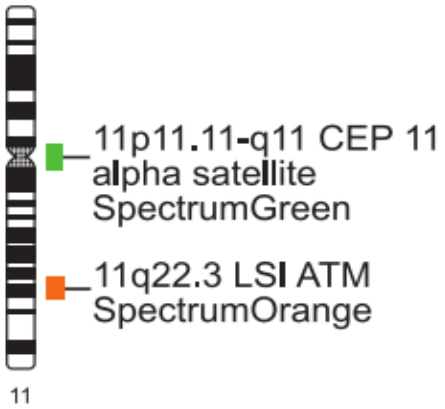
Распространенная делеция при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ)(CLL) – потеря участка 11q22.[1] Потеря ATM при ХЛЛ(CLL) связано с более агрессивным течением заболевания.[2] Комбинация зондов LSI ATM/CEP 11 использовалось для выявления делеций 11q в нескольких исследованиях, посвященных ХЛЛ (CLL).[2,3]

Описание зонда

Зонд SpectrumOrange LSI ATM, около 732 т.п.н., содержит полный ген ATM (атаксия-телеангиэктазия-мутирование) и локализуется в хромосоме 11q22.3 (chr11:107306249-108038407 Март 2006 UCSC Browser). Зонд SpectrumGreen CEP 11–контрольный, гибридизующийся в центромерном участке хромосомы 11p11.11-q11.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru





Реагенты

1. **Зонд Vysis LSI ATM SpectrumOrange/CEP 11 SpectrumGreen (номер по каталогу 30-231059)** (1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 250 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).
2. **Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826)** (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

Хранение

Зонд Vysis ATM/CEP 11 для FISH – методики (набор реактивов) необходимо хранить при температуре -20ºC (±5°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis ATM/CEP 11 для FISH – методики (набор реактивов) осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI ATM SpectrumOrange/CEP 11 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[5]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[8]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга или периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика

Необходимые материалы
- Зонды Vysis LSI ATM SpectrumOrange/CEP 11 SpectrumGreen
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
● Стеклянные сосуды Коплина
● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл
● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипетка (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

DAPI/Green флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[8].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предполагаемые результаты

Для клеток с нормальным числом повторов ожидаемый сигнальный паттерн зонда Vysis LSI ATM/CEP 11 – два оранжевых и два зеленых сигнала. В клетках с делецией ATM наблюдаются один оранжевый и два зеленых сигнала. Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. Для интерпретации таких результатов полезен метафазный анализ.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[4]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру гибридизации. • Увеличьте температуру плавления. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Hold Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH-методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум –

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения среза в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что pH и температура раствора требуемые значения. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры,	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многополосные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики.
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH методике (обработка трипсином и красителем Гимза (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (Vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте только такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые значения температуры и времени в соответствии с методикой исследования.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи резинового клея , не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH – метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель. Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многополосные фильтры дают меньше света, чем однополосные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многополосных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с данной инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (Номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

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.

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Использование зонда Vysis ATM/CEP 11 FISH Ptobe Kit осуществляется на основании европейского патента № 5,491,224 и 5, 491, приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента № RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280 929 и 6, 607, 877, приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange и HYBrite являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular
Май 2020
30-608293/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis TP53/CEP 17 FISH Probe Kit

en

REF 05N56-020

30-608294/R4

Vysis TP53/CEP 17
FISH Probe Kit
REF 05N56-020
30-608294/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-15°C -25°C	Хранить при температуре от -20°C (±5°)
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

Назначение

Зонд Vysis TP53/CEP 17 для FISH-методики (набор реактивов) предназначен для выявления числа повторов в участке связывания зонда LSI TP53, локализованных в хромосоме 17p13.1 и числа повторов в участке связывания зонда CEP 17, локализованных в центромерном участке хромосомы 17.

Краткое описание и разъяснения

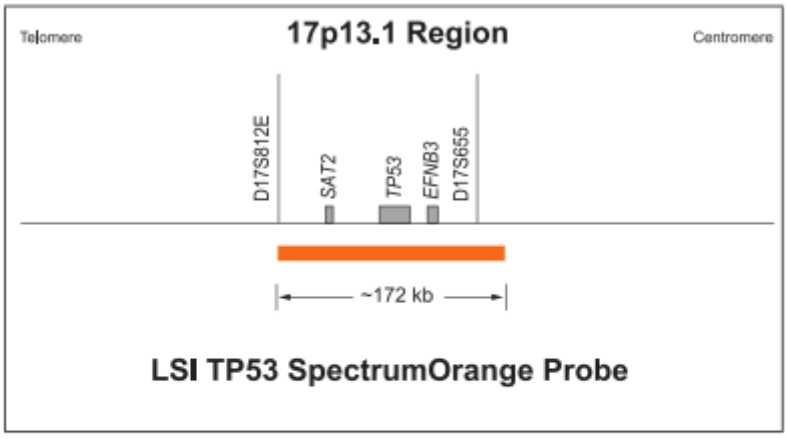
Регулярно при различных лейкемиях, например, при ХЛЛ (CLL) или множественной миеломе, встречается делеция участка 17p13, которая ассоциируется с неблагоприятным исходом заболевания, как для ХЛЛ (CLL), так и для миеломы.[1,2] Комбинация зондов LSI TP53/CEP 17 использовалась во многих исследованиях для выявления делеции участка TP53 при ХЛЛ (CLL) и при миеломе.[3,4,5]

Описание зонда

Зонд SpectrumOrange TP53, имеет размер около 172 т.п.н., содержит полный ген TP53 и локализуется в хромосоме 17p13.1 (chr17:7435119-7606823 Март 2006 UCSC Browser). Зонд

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

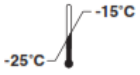
SpectrumGreen CEP 17 – контрольный, гибридизуется с центромерным участком хромосомы 17p11.1-q11.1.



Реагенты

1. **Зонд Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen (номер по каталогу 30-231062)** (1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 450 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).
2. **Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826)** (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

ХРАНЕНИЕ



Зонд Vysis TP53/CEP 17 FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis TP53/CEP17 FISH Probe Kit для FISH обкладывают сухим льдом.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis TP53 SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[7]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[10]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу

Клетки костного мозга культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика
Необходимые материалы
- Зонды Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen для FISH методики
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипетка (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).
1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[5], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Предполагаемые результаты

Ожидаемый сигнальный паттерн зонда LSI TP53/CEP 17 для клеток с нормальным количеством повторов – два оранжевых сигнала и два зеленых сигнала. В клетках с делецией TP53 наблюдается другой сигнальный паттерн - один оранжевый и два зеленых сигнала. Могут наблюдаться другие аномальные сигнальные паттерны FISH. В интерпретации таких результатов может помочь метафазный анализ.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Увеличьте температуру раствора 2X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 2X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температура в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Перед использованием компоненты смеси зонда плохо перемешаны.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	– 50ºС). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

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. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007;109(8):3489-95.
3. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correclation with segnificant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;121:287-95.
4. 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.
5. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003;101(11):4569-75.
6. 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
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Использование зонда Vysis TP53/CEP 17 FISH Ptobe Kit осуществляется на основании европейского патента № 5,491,224, приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента № RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 607, 877 приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange и HYBrite являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2010, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Май 2020
30-608294/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis MultiVysion PGT Multi-color FISH Probe Kit

en

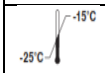
REF 08L69-010

30-608469/R4

Vysis MultiVysion PGT
Multi-color FISH Probe Kit
REF 08L69-010
30-608469/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

GTIN	Глобальный торговый идентификационный номер
	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Международная Служба поддержки клиентов
Позвоните представителю Abbott в своей стране

Перед использованием внимательно прочтите листок-вкладыш. Следует соблюдать рекомендации, указанные в инструкции внутри упаковки. Достоверность результатов не может быть гарантирована если были произведены какие-либо отклонения от рекомендаций, указанных в инструкции внутри упаковки.

Название

Vysis MultiVysion PGT Multi-color FISH Probe Kit

Назначение

Данная проба флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) предназначена для определения числа копий хромосом 13, 18, 21, X и Y.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Краткое описание и разъяснение

Преимплантационный генетический диагноз скрининга на анеуплоидию (PGD-AS) с использованием многоцветных маркированных проб FISH стал мощным диагностическим инструментом для анализа плоидного статуса нескольких хромосом одновременно. Клинические исследования говорят о том, что PGD-AS повышает процент имплантации и ограничивает спонтанные прерывания беременности у женщин с плохим исходом после ЭКО (возраст матери ≥ 35 лет (AMA), многократная неудача ЭКО (RIF), привычный выкидыш (RSA)). [1-3]

PGD-AS может содержаться на полоцитах и бластоцистах. Нанесение на полоцисты менее инвазивно, но связано с отсутствием определения наследственных заболеваний и нарушений раннего эмбрионального развития.

Набор многоцветных проб VysisMultiVysionPGTFISH содержит комплементарные пробы ДНК FISH, разработанные для анализа количества копий хромосом в бластоцитах. Набор многоцветных проб VysisMultiVysionPGTFISH определяет следующие хромосомные анеуплоидии, охватывая более 80% генетический аномалий плода: 13 хромосомы (синдром Патау), 18 (синдром Эдварда), 21 (Синдром Дауна), и X и Y (Синдром Кляйнфельтера/Тернера).

Набор многоцветных проб VysisMultiVysion PGTFISH был использован в исследованиях.[3,4,5,6]

В большом рандомизированном контролируемом исследовании, Staessen и коллеги[4] проанализировали 289 циклов ооцитов 400 пациентов, рандомизированных в одной клинике, с использованием двухэтапной методики FISH. Они исследовали хромосомы X, Y, 13, 18, 21 (этап 1) и 16, 22 (этап 2) в двух бластомерах (MultiVysionPGT).

В большом рандомизированном контролируемом исследовании Kahramanи коллеги[5] провели скрининг 276 пар, воспользовавшихся ЭКО, включая группы AMA, RIF, RSA, иAGCM (аномальная морфология гаметы) с использованием MultiVysionPB. Исследование дало повод думать, что AGCM является одним из основных показаний к PGD, т.к. в данной группе наблюдались высокий уровень анеуплоидий. Более того, исследование установило, что PGD-AS с использованием MultiVysionPB является полезным инструментом, повышающим успех ЭКО у пар с плохим прогнозом, которые пользуются вспомогательными репродуктивными методиками.[5]

Описание пробы

Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PGT содержит смесь проб 5-ти цветовых последовательностей ДНК, гомологичных специфическим областям хромосом 13, 18, 21, X и Y. Каждая из проб напрямую маркирована одним из флуорофоров Vysis. Смесь проб состоит из:

LSI 13: Проба ДНК, охватывающая генRB1 (13q14) маркированный SpectrumRed

CEP 18: D18Z1 сателлитная проба ДНК (18p11.1-q11.1) маркированная SpectrumAqua

LSI 21: ДНК пробалокусов D21S341, D21S342, D21S339, EGR, иD21S338 (21q22.13-21q22.2) маркированных SpectrumGreen

CEP X: DXZ1 альфа-сателлитная проба ДНК соответствующая Xp11.1-q11.1 маркированная SpectrumBlue

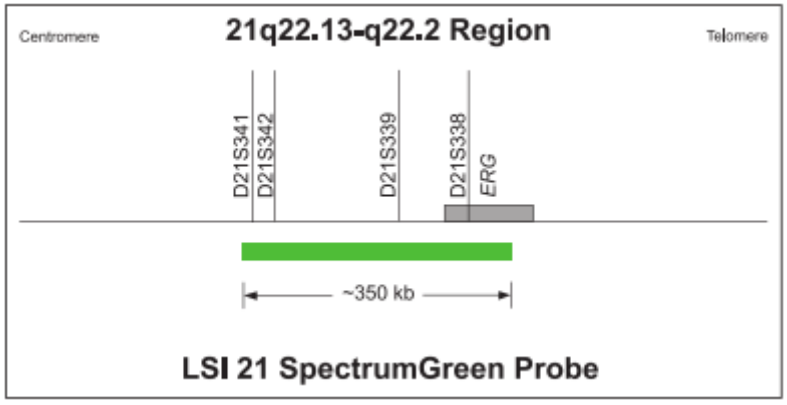
CEP Y: DYZ3 альфа-сателлитная пробаДНК, соответствующая Yp11.1-q11.1, маркированная SpectrumGold.

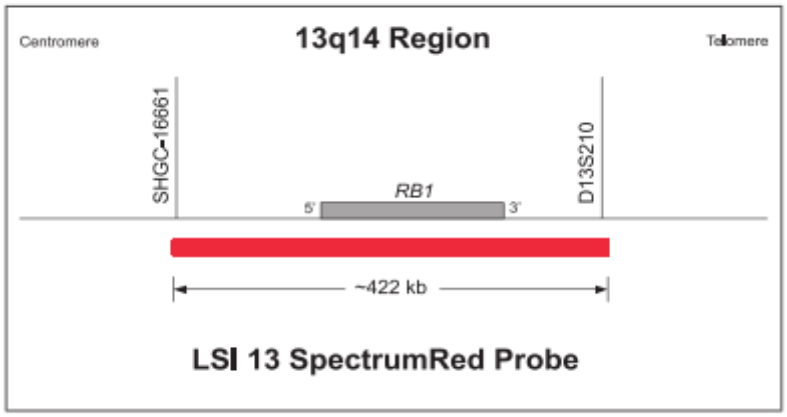
Маркированная флуорофором человеческая плацентарная ДНК (SpectrumBlue, SpectrumAqua, SpectrumOrange) также включена в пробную смесь для обеспечения окрашивания ядер, которые не взаимодействуют с флуоресцентным сигналом пробы. Немаркированная блокирующая ДНК также включена в пробу для подавления последствий распространения целевых локусов на другие хромосомы.

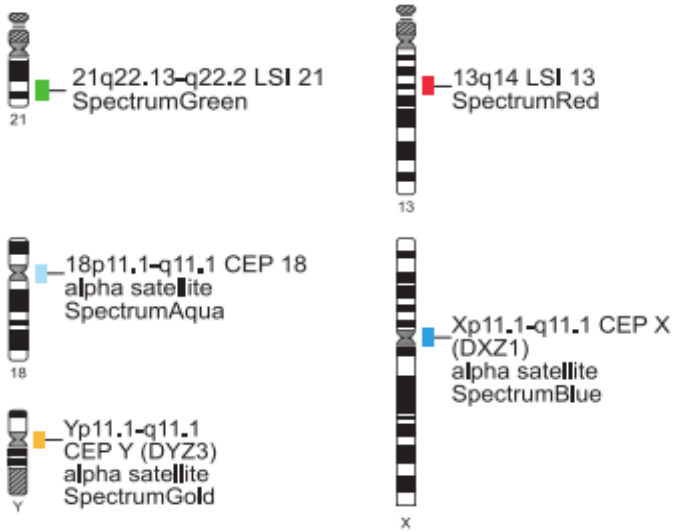
Меченая флуорохромом плацентарная ДНК человека (SpectrumBlue, SpectrumAqua, SpectrumOrange) также входит в состав смеси зонда, чтобы обеспечить ядерное окрашивание, которое не будет создавать помехи для флуоресцентного сигнала. Немеченая блокирующая ДНК также включена в состав смеси зондов для подавления сиквенсовых последовательностей, содержащихся в целевых локусах, которые являются общими для других хромосом.

Проба LSI 13 размером приблизительно 422 Kb (chr13:47633474-48055374, февраль 2009, Человеческий геномный браузер).[12] Проба LSI 21 размером 350 Kb (chr21:39491467-39841748), февраль 2009, Человеческий геномный браузер)[12].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru







Реагенты

1. Vysis Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PGT FISH (кат. номер # 30-111080)
30 мкл (10 исследований). Флуорофор-маркированные пробы ДНК хромосом 13, 18, 21,X и Yв буфере для гибридизации, содержащем декстрана сульфат, формамид и SSC.

Инструкции по хранению

Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PGT FISH должен храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.
Дата истечения срока годности указана на внешней упаковке и пробирке.
Разрушение: флуорофоры быстро обесцвечиваются на свету. Чтобы не допустить этого, обращайтесь со всеми растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, при слабом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

освещении. Проводите все этапы работы, для которых не требуется освещение (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Условия транспортировки
Многоцветная проба Vysis MultiVysion PGT FISH транспортируется в сухом льду.
Если вы получили реагенты в состоянии, отличном от указанного на маркировке, или в поврежденном виде, свяжитесь с технической службой компании AbbottMolecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**
Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis MultiVysion PGT Multi-color Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[9], CLSI документ M29-A3[10], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[11].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[8]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[11].

Vysis MultiVysion PB Multi-color Probes

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

Подготовьте следующие растворы для подготовки бластомера и исследования Vysis MultiVysion PGT FISH

Приготовление рабочих растворов реагентов для подготовки бластоцитов

Гипотонический раствор (0.6% БТА, 1% цитрат натрия) [для подготовки бластоцитов]:
Добавьте:
0.3 г альбумина бычьей сыворотки (БТА)
0.5 г цитрата натрия
50 мл очищенной воды
Хорошо перемешайте. Профильтруйте через 0.2 мкм фильтр. Хранить при 2 - 8°C. Использовать в течение 1 месяца.

Фиксатор Карноя:
Смешайте:
25 мл уксусной кислоты
75 мл метанола
Вылейте в стеклянный сосуд с крышкой. Переверните сосуд несколько раз. Хранить при температуре -20°C. Использовать в течение 2 часов. Утилизировать после использования.
Метанол: Налейте примерно 70 мл чистого метанола в стеклянный сосуд Коплина. Немедленно используйте. Закройте крышкой, если сосуд не используется.

Приготовление рабочих растворов реагентов для исследования MultiVysion

20XSSC (pH 5.3):
Смешайте:
66 г 20XSSC мл
200 мл очищенной воды
Получится общий объем в 250 мл.
Тщательно перемешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Отрегулируйте до pH 5.3 концентрированной HCl, если необходимо. Доведите общий объем до 250 мл. Профильтруйте через 0.45 мкм фильтр. Хранить в закрытом контейнере при комнатной температуре до 6 месяцев.

0.3% NP-40 в 0.7XSSC (Раствор для отмывки после гибридизации):
Смешайте:
950 мл* очищенной воды
20 мл 20XSSC pH 5.3
3 мл NP-40
1000 мл общий объем
Доведите объем до 1000 мл очищенной водой. Тщательно перемешайте. Отрегулируйте pH до 7.0 - 7.5 1N NaOH, при необходимости, используя pH метр со стеклянным pH электродом. Профильтруйте через 0,45 мкм фильтр. Хранить неиспользованный раствор в закрытом контейнере при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Утилизировать в конце дня.
*или доведите объем до 1000 мл очищенной водой

0.1% NP-40 в 2X SSC (Раствор для отмывки после гибридизации):
Смешайте:
100 мл 20XSSC pH 5.3
899 мл* очищенной воды
1 мл NP-40
1000 мл общий объем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Доведите объем до 1000 мл очищенной водой. Тщательно перемешайте. Отрегулируйте pH до 7.0 - 7.5 1N NaOH, при необходимости, используя pH метр со стеклянным pH электродом. Профильтруйте через 0,45 мкм фильтр. Добавьте70 мл в сосуд Коплина и поддерживайте комнатную температуру. Хранить неиспользованный раствор в закрытом контейнере при комнатной температуре до 6 месяцев. Утилизировать раствор, который был использован при количественном определении в конце каждого дня.
*или доведите объем до 1000 мл очищенной водой

Подготовка человеческих бластоцитов для флуоресцентной гибридизации InSitu
Данная методика используется после удаления бластоцитов. Бластоциты выделяются из неоплодотворенных яйцеклеток путем механического разделения [7]

Методика
Приготовьте бластоцит и поместите его в микрокаплю среды на чашке Петри диаметром 35 мм.
1. Подготовьте гипотонический раствор.
2. Подготовьте сосуд Коплина с метанолом.
3. Обведите небольшой круг на дне чашки Петри 35 x 10 мм. Круг идентифицирует целевую область для помещения бластомеров.
4. Запишите идентификационные признаки образца и соответствующую информацию о замороженной области микропрепарата на предметном стекле. Очистите препарат с помощью фиксатора Карноя и нетканого материала.
5. Подогрейте наконечник 25 мкл капиллярной пипетки с использованием микрофакела и одновременно вытяните нагретый наконечник пипетки так, чтобы его внутренний диаметр составлял 50 мкм. Убедитесь, что вытянутый наконечник пипетки имеет равномерные края и не является острым. Острый наконечник может повредить бластомер. Снова отколите наконечник, если это необходимо для получения гладкой поверхности. Необходимо убедиться в том, что размер отверстия наконечника пипетки больше размера бластомера.
6. Втяните небольшое количество (примерно 2-3 мкл) гипотонического раствора пипеткой.
7. Используя стереомикроскоп, поместите бластомер в чашку Петри.
8. Осторожно втяните бластомер пипеткой и перенесите его в чашку Петри с каплей гипотонического раствора, размещая его в центре очерченного круга.
9. Оставьте бластомер в гипотоническом растворе на 5 минут. Переместите бластомер из воды путем его аспирации пипеткой с малым количеством гипотонического раствора. Соблюдайте осторожность, чтобы не втянуть бластомер слишком далеко вглубь пипетки. Переместите клетку на микроскопический препарат с малым количеством гипотонического раствора.
10. Поместите микропрепарат в инвертационный микроскоп. Дайте бластомеру подсохнуть в капле раствора на препарате, контролируя процесс через инвертационный микроскоп. Внимательно следите за бластомером, пока процесс высыхания почти не закончится. Перед завершением высыхания, втяните той же пипеткой небольшое количество фиксатора (примерно 2-3 мкл) и капните фиксатор на бластомер.
11. Непрерывно наблюдайте за клеткой через инвертационный микроскоп, в то время как фиксатор начнет высыхать.
Перед завершением высыхания поместите еще одну каплю фиксатора из пипетки на клетку. Повторите шаг 11 несколько раз, пока не будет очевидно, что произошло растворение цитоплазмы и осталось только ядро.
Примечание: Перед нанесением следующей капли не дожидайтесь полного высыхания фиксатора. Полное удаление цитоплазмы обязательно для оптимальной гибридизации пробы.
12. С помощью специального карандаша (алмазного или пр.) очертите 2 круга вокруг ядра на поверхности предметного стекла. Один круг должен быть немного больше, чем другой, т.е., один круг находится внутри другого с клеткой в середине малого круга. Круг вокруг клетки позволяет проще локализовать клетку после процесса гибридизации.
13. Поместите стекло с препаратом в сосуд Коплина, содержащий метанол , до начала гибридизации.
14. Непосредственно перед проведением гибридизации или в случае помещения предметного стекла на хранение, если гибридизация не будет проводиться в этот день, уберите предметное стекло из раствора метанола и дайте высохнуть.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

15. С помощью шкалы нониуса микроскопа или предметного стекла с разметкой областей (стекла England Finder) разместите и зафиксируйте местоположение клетки на предметном стекле. Эти координаты помогут локализовать клетку после гибридизации.
16. Очертите карбидным маркером на другой стороне предметного стекла другой больший круг вокруг клетки. Определите область, куда необходимо поместить 3 мкл раствора пробы, очертив круг тем же маркером с обратной (нижней) стороны предметного стекла.
17. В случае, если исследование MultiVysion не будет проводиться сразу же, поместите предметное стекло в контейнер с крышкой для хранения предметных стекол и храните при температуре - 20˚ С до следующего использования.

Использование контрольных препаратов
Контрольные препараты должны использоваться параллельно с образцами препаратов для мониторинга эффективности исследования. Рекомендуется использовать контрольные препараты каждый день тестирования FISH. Рекомендуется использовать не гибридизированные контрольные препаратыVysis ProbeChek MultiVysion (кат. номер 05J07-001).

Методика флуоресцентной гибридизации MultiVysion In Situ

Настройка параметров HYBrite
См. Руководство пользователя HYBrite для получения информации об использовании инструмента.

Методика

Требуемые материалы
● Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PGT

Требуемые, но не предоставляемые материалы
- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1 -1 0 м к л
- Микродозатор объемом 1 -1 0 м к л
- pHметр
- Предварительно очищенные предметные стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (вортекс)
- Водяная баня (37°Си 72°С)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°Синкубатор
- 20XSSC
- NP-40
- Формамид,
- КрасительDAPIII
    - Столик для нагрева

Настройка параметров HYBrite
См. Руководство пользователя HYBrite для получения дополнительной информации по использованию данного инструмента.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Увлажните две полоски бумажного полотенца с помощью воды и поместите полотенца в углубления нагревательной поверхности устройства HYBrite. Не наливайте воду напрямую в углубление.

2. Включите HYBrite. Установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа.
Дайте устройству HYBrite нагреться до 37°C.

Гибридизация
3. Возьмите пробу MultiVysion PGT из помещения для хранения с температурой-20°C и дайте нагреться до комнатной температуры. Если образцы препаратов были на хранении, дайте им нагреться до комнатной температуры.
4. Поместите препараты образцов на поверхность HYBrite. Заполните пустые ячейки пустыми предметными стеклами.
5. Добавьте 3 мкл раствора пробы MultiVysion к области препарата, в которой находится клетка.
6. Накройте 12 мм покровным стеклом целевую область сразу же после нанесения пробного раствора. (Осторожно поместите покровное стекло на пробный раствор, сначала один край, чтобы избежать образования пузырьков).
7. Вырежьте кусочек пленки Parafilm размером с микроскопический препарат и поместите его на препарат с покровным стеклом. Parafilm предупреждает высыхание пробного раствора во время гибридизации.
8. Закройте крышку HYBrite и начните программу гибридизации/плавления. Программа начнется с фазы плавления, а завершится 4-х часовой гибридизацией.
Примечание: Максимально рекомендованное время гибридизации составляет 8 часов; тем не менее, 4 часа является оптимальной длительностью. Более долгая гибридизация может привести к избыточному окрашиванию ядер, что может повлиять на получение сигналов.

Помывка препаратов
9. Во время гибридизации, наполните сосуд Коплина 0.4X SSC/0.3% NP-40 и поместите в водяную баню 73°C. Используя калиброванный термометр, проверьте температуру раствора снаружи сосуда до добавления препаратов для помывки. Температура раствора должна составлять 73 ± 1°C.
10. Наполните второй сосуд 2X SSC/ 0.1% NP-40 и оставьте при комнатной температуре.
11. По завершении программы HYBrite, удалите препараты из HYBrite. Удалите Parafilm и покровные стекла с препаратов.
12. Поместите препараты в 0.4X SSC/ 0.3% NP-40 сразу же после удаления покровного стекла. Когда все препараты помещены в сосуд (максимум 4 препарата), выдерживайте их в течение 5 минут. Примечание: Не осуществляйте мойку более 4 препаратов одновременно в одном и том же сосуде. Помещение отдельного препарата в сосуд должно занимать несколько секунд. Если это так, убедитесь, что ни один препарат не будет находиться в промывочном буфере более 5 минут. После удаления препаратов, дайте температуре дойти до 73±1°C перед отмывкой следующих препаратов.
13. Через 5 минут, удалите препараты из промывочного раствора и поместите препараты в сосуд Коплина, содержащий 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре. Выдержите 1 минуту.
14. Удалите препараты из отмывочного раствора и поместите вертикально в темную область на бумажное полотенце для полного высыхания.
15. Добавьте 3 мкл Antifade II в целевую область и накройте 12 мм круглым покровным стеклом, избегая образования пузырьков воздуха. Не добавляйте краситель DAPI, так как он заблокируют сигнал маркированной пробы SpectrumBlue. Клетки или хромосомы могут быть локализованы с использованием набора однополосных фильтров Aqua, т.к. SpectrumAqua флуорофор-маркированная HP ДНК, содержащаяся в пробной смеси, позволяет идентифицировать клетки и определить их границы.
Примечание: Если желательным является другой тип окрашивания для идентификации клеток и их локализации, рекомендуется окрашивание разведенным пропидиум иодидом. Краситель Vysis пропидиум иодид (кат. номер. 07J06-001) должен быть (v/v) разведен 1:6 с Vysis Antifade II (кат.номер. 06J29-001). Хорошо перемешайте и нанесите на целевую область. Используйте набор оранжевых однополосных фильтров для локализации клетки.
16. Рассмотрите препараты с помощью флуоресцентной микроскопии и соответствующего набора фильтров (см.ниже).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

17. Гибридизированные образцы могут храниться до 1 месяца при температуре-20°С без значительного разрушения флуоресцентных сигналов пробы.

Визуализация результатов
Соответствующая визуализация и анализ гибридизации MultiVysion PGT в значительной степени зависит от использования оптимального набора фильтров и хорошо настроенного флуоресцентного микроскопа. Некоторые наборы фильтров, необходимые для визуализации результатов MultiVysion PGT, могут отсутствовать в вашей лаборатории. Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для получения дополнительной информации по поводу спецификаций наборов фильтров.
Все наборы фильтров являются доступными через заказ Abbott Molecular, Inc.
Следующие минимальные наборы фильтров рекомендованы для визуализации результатов MultiVysion PGT.
1. Голубой/аква двухполосный набор
2. Зеленый/красный двухполосный набор
3. Желтый однополосный набор
4. Аква однополосный набор (опциональный для уточнения сигналов, наблюдаемых при синем/аква двухполосном наборе при слабой визуализации голубого или в случае, если интенсивность сигнала аква меньше оптимального).

Наборы однополосных фильтров также являются доступными для каждой из 5 флуоресцентных проб (SpectrumBlue, SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumGold и SpectrumRed) для максимальной детализации каждого из отдельных сигналов FISH.Однополосные фильтры дают самую большую интенсивность флуоресценции и самый низкое фоновое свечение, в результате чего дают самые точные флуоресцентные сигналы. К тому же, перекрывающиеся сигналы, образованные в результате позиционирования целевой ДНК в пределах ядра клетки, лучше всего различимы с использованием наборов однополосных фильтров. Данный метод анализа обеспечивает наиболее простую и самую точную интерпретацию сигнала пробы. Изображения с гнала пробы также могут быть получены с помощью пяти отдельных однополосных фильтров.

Примечание: При использовании наборов однополосных фильтров для визуализации или изображения, сигнал пробы SpectrumBlue должен наблюдаться или изображаться первым. Данная последовательность рекомендуется с целью минимизации продолжительности фотообесцвечивания путем рассматривания наиболее чувствительных флуорофоров первыми. Если метод однополосных фильтров является предпочтительным, тогда они должны быть использованы следующим образом:

1. Голубой однополосный набор (для SpectrumBlue)
2. Аква(синий) однополосный набор (для SpectrumAqua)
3. Зеленый однополосный набор (для SpectrumGreen)
4. Желтый однополосный набор (для SpectrumGold)
5. Красный однополосный набор (для SpectrumRed)

Примечание: Некоторое наложение может наблюдаться при использовании наборов однополосных фильтров. Флуоресцентные сигналы SpectrumAqua попадать в набор голубых однополосных фильтров и яркие флуоресцентные сигналы SpectrumBlue затекают в набор однополосных фильтров аква (синий).
Яркие флуоресцентные сигналы SpectrumGold могут немного протекать в зеленый или зеленый/красный наборы фильтров.

Проверьте результаты гибридизации следующим образом:
1. Обнаружьте целевую клетку методом фазово-контрастной микроскопии, при малом увеличении (100X) с использованием предварительно записанных координат.
2. После локализации клетки без сдвига кратности увеличения переключитесь на флуоресцентный свет с использованием набора однополосных фильтров аква и ре-локализуйте клетку при малом увеличении (100X). После релокализации клетки методом флуоресценции переключитесь на большое увеличение (1000X) для анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Если набор двухполосных фильтров аква/голубой используется для анализа SpectrumAqua и SpectrumBlue маркированных проб, локализуйте и проведите анализ следующим образом**:**
Локализуйте клетку, используя набор однополосных фильтров аква.
Анализируйте каждую из проб с использованием следующей последовательности фильтров: 1) двухполосный аква/голубой, 2) двухполосный зеленый/красный, 3) желтый однополосный.
Примечание: Рекомендуется, чтобы образец был визуализирован в данной последовательности для минимизации фотообесцвечивания. При данной последовательности, наиболее чувствительные флуорофоры подвергаются воздействию света первыми.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Этот комлект не предназначен для оценки трисомии 21 хромосомы.
- Для оптимального выполнения данного исследования требуется соответствующий образец, подготовка и хранение как указано внутри упаковки.
- Vysis MultiVysion PGT Multi-Color FISH Probe Kit предназначен для идентификации количественного определения хромосомных аббераций хромосом 13, 18, 21, X, Y.
- Производительность Vysis MultiVysion PGT Multi-Color FISH Probe Kit была установлена с использованием методик, изложенных в данном листке-вкладыше к этому набору. Изменения в этих методиках могут повлиять на выполнение анализа.
- Интерпретация любых результатов исследований должна оцениваться в контексте других результатов лабораторных исследований.
- Результаты FISH-исследований могут быть неинформативными, если качество образца или подготовка предметных стекол была проведена неадекватно.
- Исследователи, выполняющие подсчет FISH-сигналов должны быть способными визуально различать красный, зеленый, оранжевый, голубой и синий сигналы.
- Интерпретация любых результатов исследований должна оцениваться в рамках контекста других результатов лабораторных исследований.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod*
Biomed Online. 2003;7(1):91-7.
2. Munne S, Chen S, Fischer J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2005;84(2):331-5.
3. Bloechle M, Marr S, Guillot P, et al. P-698: Polar body analysis of 314 unfertilized oocytes: what can we learn? *Fertil Steril*. 2006;86(3) Suppl. 2:S392-3.
4. Staessen C, Platteau P, Van Assche, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004;19(12):2849-58.
5. Kahraman S, Benkhalifa M, Donmez E, et al. The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques. *Prenat Diagn*. 2004;24(4):307-11.
6. Baart EB, Martini E, Van Opstal D. Screening for aneuploidies of ten different chromosomes in two rounds of FISH: a short and reliable protocol. *Prenat Diagn*. 2004;24(12):955-61.
7. Verlinsky Y and Kuliev A, eds. *Preimplantation Diagnosis of Genetic Diseases: A New Technique for Assisted Reproduction*. New York: Wiley Liss; 1994.
8. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington,
DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.].
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
11. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12. Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz. The UCSC Genome Browser. © The Regents of the University of California. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=185806115&clade=mammal&org=Human&db=hg19. Accessed August 28, 2014.

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.
Vysis MultyVysion PGT Multi-Color FISH Probe Kit и другие многочисленные прямо меченые ДНК-зонды защищены американскими патентами 5,663,319 и 5,491,224, приписанными Abbott Molecular. Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Методы детектирования одновременных сигналов при гибридизации защищены Американскими патентами 6, 203, 977, выданными Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

MultyVysion, ProbeCheck, SpectrumRed, SpectrumBlue, SpectrumGold, SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectraVysion, HYBrite CEP, LSI, и Vysis являются торговыми марками группы компании Abbott в различных юрисдикциях.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608469/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis EGFR/CEP 7 FISH Probe Kit

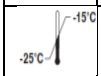
en

REF 01N35-020

30-608213/R4

Vysis EGFR/CEP 7
FISH Probe Kit
REF 01N35-020
30-608213/R4

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Зонд Vysis LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen для FISH (анализ EGFR/CEP7) предназначен для подсчета количества копий гена EGFR и центромеры 7 в образцах злокачественной опухоли легких человека, фиксированных в формалине и залитых парафином, с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Анализ EGFR/CEP 7 используется у пациентов, которые получали химиотерапию и которым планируется терапия Иресса (IRESSA) по поводу прогрессирующего или метастатического немелкоклеточного рака легких.

Описание процедуры и пояснения

Немелкоклеточный рак легких (NSCLC) является основной причиной смерти от раковых заболеваний в мире[1]

Учитывая что пятилетняя смертность составляет 85–95%, назрела острая необходимость в улучшении методов отбора пациентов, у которых специфическая терапия будет максимально эффективной.[2]

Расширение или сверхэкспрессия гена EGFR приводит к развитию многих солидных опухолей, в т.ч. немелкоклеточного рака легких.[4]

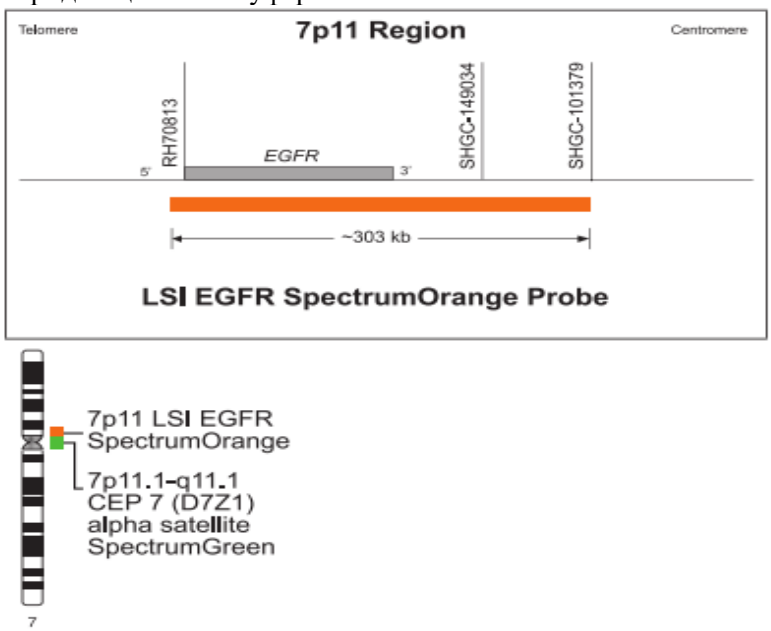
Ген EGFR кодирует трансмембранный гликопротеин с тирозинкиназной активностью, который является главным участниками процесса контроля пролиферации клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ингибирование EGFR с помощью лекарственных препаратов, например, Иресссы, блокирующей тирозинкиназный домен гена EGFR, обеспечивает уменьшение пролиферации раковых клеток и, соответственно, подавление роста опухоли. Большое абсолютное количество копий гена EGFR или большое количество копий гена EGFR по отношению к количеству копий 7-ой хромосомы (расширение гена) у пациентов с немелкоклеточным раком легких, получающих Иресссу (IRESSA), свидетельствует об увеличении продолжительности жизни.[3,5]

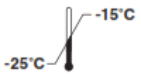
Гибридизация *in situ* (FISH) позволяет визуализировать специфические последовательности нуклеиновой кислоты в препарате клеток. FISH включает точную гибридизацию однонитевого ДНК-зонда, меченого флуорофором, на комплементарные последовательности. Визуализация гибридизации осуществляется с помощью флуоресцентной микроскопии.

Описание зонда
Зонд LSI EGFR мечен SpectrumOrange и покрывает участок длиной около 300 килобаз, содержащий ген EGFR. Зонд CEP 7, меченый SpectrumGreen, гибридизирует альфасателлитную ДНК, расположенную на центромере 7-ой хромосомы (7p11.1-q11.1). Смесь зондов находится в гибридизационном буфере.



РЕАГЕНТЫ
1. Набор зондов Vysis LSI EGFR SpectrumOrange/ CEP 7 SpectrumGreen (серия № 30191053). (200 мкл/флакон). 17,5 нг/мкл. ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

ХРАНЕНИЕ



Vysis EGFR/CEP7 FISH Probe Kit следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Условия транспортировки
Набор Vysis EGFR/CEP7 FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**
Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probes

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[5]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[8]

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

- Смесь ДНК-зондов Vysis LSI EGFR SpectrumOrange/ CEP 7 SpectrumGreen содержит формамид, обладающий тератогенным эффектом. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Не подвергайте образцы воздействию кислот, сильных оснований или высокойтемпературы. Это может привести к повреждению ДНК и получению ошибочного результата FISH.
- Несоблюдение условий денатурации, гибридизации и визуализации может привести к получению неприемлемых или ошибочных результатов.
- Для гибридизации необходимо использовать только реагенты, поставляемые компанией Эббот Молекуляр Инк. (Abbot Molecular Inc.)
- Набор должен храниться в соответствующих условиях, в противном случае результаты анализа будут недостоверными.
- Для измерения температуры растворов, водяной бани и термостата требуются калиброванные термометры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Каждый раз перед использованием раствора для предварительной обработки и промывочных буферов измеряйте их температуру в сосуде Коплина с помощь калиброванного термометра.
- Все опасные материалы следует утилизировать согласно соответствующим стандартам учреждения.
- Анализ EGFR/CEP 7 проводят только с использованием образцов легких человека, фиксированных в формалине и залитых парафином. Другие типы тканей требуют скорректированных условий предварительной обработки, гибридизации или отмывки.

Разрушение:
Под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Примечания к процедуре: Перед использованием реагенты необходимо разморозить при температуре окружающей среды. Затем отцентрифугировать каждую пробирку в течении 2-3 секунд, используя стандартную настольную центрифугу.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Образцы ткани, фиксированные в формалине и залитые парафином, поместите на предметные стекла с использованием стандартных процедур. Для обнаружения целевых областей, проводится окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) на предметном стекле, проведя 10 последовательных манипуляций на каждом слайде. Для приготовления образцов, заключенных в парафин для FISH методики, образцы должны быть депарафинизированы и обработаны для максимальной проницаемости тканей и гибридизации с использованием стандартных процедур. Обратитесь к инструкции вкладышу внутри набора для предварительной обработки Abbott Molecular Paraffin Pretreatment Kit IV & PostHyb Wash Buffer Kit (01N31-005).

Необходимые материалы (в комплекте)
- Набор зондов Vysis LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen

Необходимые материалы (не в комплекте)
- Набор буферных растворов (Abbott Molecular Paraffin Pretreatment IV & PostHybridization Wash Buffer Kit) (список 01N31-005);
- Контркраситель DAPI I (Кат. номер №30-804840, 30-804860 или 30-804960).

Лабораторное оборудование
- Прибор ThermoBrite/Воздушный инкубатор/микроволновка/комфорка (от 56 до 68°C)
- Флуоресцентный микроскоп с рекомендуемыми фильтрами (См. раздел Оборудование и аксессуары для микроскопа).
- Чистые силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1 – 10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые пробирки для микроцентрифуги (0,5 мл или 1,5 мл)
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Градуированный цилиндр
- Статичная водяная баня и водяная баня с циркуляцией (37±1°C)
- Водяные бани с циркуляцией (74±1°C и 80±1°C)

Примечание: статичные водяные бани не обеспечивают должный контроль высокой температуры.
- Баня с очищенной водой (от 40 до 45°C)
- Маркер с алмазным наконечником или стойкий к растворителям маркер
- Пинцет

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (12×50 мл) Можете использовать тип: Wheaton Product № 900570 вертикальный сосуд для окрашивания
- Калиброванный термометр
- Коробка для предметных стекол с крышкой

Лабораторные реагенты
- Осветлитель Hemo-De
- Гематоксилин и эозин
- Иммерсионное масло для флуоресцентного микроскопа
- 100 % этанол. Хранить при комнатной температуре
- Дистиллированная вода
- Резиновый клей

Анализ проводят только с использованием образцов легких человека, фиксированных в формалине и залитых парафином. Другие типы тканей требуют скорректированных условий предварительной обработки, гибридизации или отмывки.

Микроскоп и дополнительные устройства
Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. *При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ.* Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH. Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы- роизводителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировкиртутной лампы.

Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: компания Эббот Молекуляр (Abbott Molecular) выпускает наборы фильтров с одной и двумя полосами пропускания, которые оптимизированы для использования совместно с наборами ДНК-зондов CEP и LSI и подходят для большинства моделей флуоресцентных микроскопов. Для набора EGFR/CEP 7 рекомендуется использовать фильтры DAPI/9-Orange и DAPI/Green с двумя полосами пропускания. По желанию можно также использовать DAPI, оранжевые и зеленые фильтры с одной полосой пропускания. Мы не рекомендуем использовать набор фильтров с тремя полосами пропускания в связи с близким расположением оранжевого и зеленого сигналов. Гибридизация зондов LSI EGFR и CEP 7 на нужные участки проявляется в виде оранжевого и зеленого свечения соответственно. Все остальные ДНК будут светиться голубым за счет красителя DAPI.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Протокол анализа
Меры предосторожности

Обратитесь к разделу меры предосторожности (вкладыш внутри упаковки) перед началом работы с образцами.

Сбор образцов и проведение анализа

Следующая процедура должна быть разработана для использована с фиксированными в формалине, залитыми в парафин образцах ткани легкого. Следует избегать контакта образцов с кислотами, сильными основаниями или воздействию высокой температуры. Установлено, что такие воздействия повреждают ДНК и могут привести к ошибочным результатам FISH-исследования. Используйте только образцы ткани легкого, фиксированного в формалине для получения хороших срезов тканей. Предпочтительное время фиксации для образцов тканей от 6 до 48 часов. Подготовьте срезы толщиной 4±1 μm.

Подготовка слайдов из фиксированных в формалине, залитых в парафин образцов
Примечание: если образцы уже были приготовлены, начинайте процедуру с шага 5.
1. С помощью микротома подготовьте срезы шириной 4 – 5 мкм.
2. Подержите срезы над поверхностью водяной бани (40°C) с дистиллированной водой, например, прошедшей тройную очистку.
3. Поместите срез на положительно заряженное предметное стекло.
4. Высушите на воздухе.
5. Выполните традиционное окрашивание среза гематоксилином и эозином.
6. Окрашенные срезы исследует патоморфолог, который с помощью маркера или резца по стеклу отмечает (обводит в кружок) участки, где преобладают раковые клетки.
7. С помощью резца на боковой части предметного стекла сделайте отметки напротив соответствующих неокрашенных участков.
8. Неокрашенные микропрепараты выдерживайте при 56°C до 64°C в течение 2 ч. – целой ночи.
Примечание: Если используется парафин с температурой плавления выше, чем 54°C, увеличьте температуру до 68°C.
9. Неокрашенные микропрепараты обработайте согласно приведенным ниже инструкциям.

Предгибридизационные процедуры
Данная процедура оптимизирована для использования с тканью легкого, заключенного в парафин. Для ткани легкого, обратитесь к инструкции по использованию внутри упаковки Abbott Molecular Paraffin Pretreatment Kit IV & PostHyb Wash Buffer Kit, Процедура Депарафинизации и Предобработки слайдов. Для других типов тканей может потребоваться скорректированная предварительная обработка, гибридизация, промывка и или/реагенты.

Гибридизация
Для получения подробной информации об использовании обратитесь к инструкции по применению *ThermoBrite*.

1. Погрузите микропрепараты в 70 % раствор этанола на 1 минуту.
2. Погрузите микропрепараты в 85 % раствор этанола на 1 минуту.
3. Погрузите микропрепарат в 100 % этанол на 1 минуту.
4. Высушите слайды в течении от 2 до 5 минут.
5. Намочите увлажняющую карту водой и поместите в специальные выемки ThermoBrite.
6. Установите **температуру денатурации** 71°C и **время денатурации** 5 минут; **температуру гибридизации** на 37°C и **время гибридизации** минимум чем н 12 часов, максимум на 30 часов.
7. Нанесите 10 мкл смеси зонда на микропрепарат и сразу же накройте его покровным стеклом.
8. Края обработайте резиновым клеем.
9. Поместите слайды в прибор *ThermoBrite* и запустите программу гибридизации. Гибридизуйте слайды всю ночь или минимум 12 часов.
10. После окончания процедуры гибридизации, перейдите к процедуре отмывки.
Постгибридизационная процедура

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для проведения Постгибридизационной процедуры обратитесь обратитесь к инструкции по использованию внутри упаковки Abbott Molecular Paraffin Pretreatment Kit IV & PostHyb Wash Buffer Kit.

Примечание: Гибридизованные слайды необходимо промыть в день окончания процедуры гибридизации.

Визуализация гибридизованных слайдов.

1. Высушите микропрепарат (-ы) на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI и накройте покровным стеклом. Храните слайды в темноте.
3. Хранить слайды при -20°C (±5°C), если подсчет не возможен в течении 4 часов, обратитесь к шагу 2.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[4].

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках с нормальным количеством копий гена EGFR и 7-ой хромосомы будут наблюдаться два оранжевых (EGFR) и два зеленых сигнала (7-ая хромосома). При наличии патологического количества копий гена EGFR будет наблюдаться три или более оранжевых сигналов. Судить о количестве копий 7-ой хромосомы можно по зеленым сигналам в той же клетке. Таким образом, подсчет оранжевых EGFR и зеленых CEP 7 сигналов дает представление об абсолютном количестве копий гена EGFR и количестве копий EGFR по отношению к общему количеству копий 7-ой хромосомы.

Обратите внимание, что приготовление срезов образца, залитых парафином, приводит к усечению ядер. В результате в некоторых ядрах наблюдается меньшее количество сигналов, чем до приготовления срезов. Например, в некоторых нормальных ядрах количество сигналов EGFR и CEP 7 будет меньше двух. Этот феномен объясняется в пороговых значениях, представленных в критериях оценки (см. ниже раздел (**Интерпретация результатов**).

УСТРАНЕНИЕ НЕПОЛАДОК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА

Если гибридизация не удалась или не получены адекватные сигналы, приготовьте новые слайды, если это возможно или попробовать пересчитать сигналы в этом же слайде. При избыточном действии Протеазы, исходя из окрашивания контркрасителем DAPI, можно попробовать использовать более мягкую процедуру предварительной обработки. При недостаточном действии Протеазы, рекомендуется более жесткая процедура предварительной обработки или тот же образец может пройти дополнительную обработку. Обратитесь к Разделу «Устранение неисправностей» (Табл. 1) внутри упаковки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Инструкция по устранению проблем

Проблема	Возможная причина	Решение
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Неподходящий набор фильтров	Используйте рекомендуемые фильтры
	Нарушение работы микроскопа	Свяжитесь с техническим представителем компании производителем микроскопа
	Неподходящие лампы (т.е. ксеноновые или вольфрамовые)	Используйте ртутную лампу (желательно, 100 Вт)
	Просроченная ртутная лампа	Замените старую лампу на новую
	Смещение ртутной лампы	Выровняйте лампу
	Грязные и/или потрескавшиеся собирательные линзы	Протрите и замените линзы
		Протрите или замените зеркало
	Грязное или разбитое зеркало	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37 ± 1ºC
	Неподходящие условия гибридизации	Увеличьте продолжительность гибридизации (не менее 14 ч)
	Неподходящая температура промывочных растворов после гибридизации	Убедитесь в том, что температура водяной бани составляет 73 - 75ºC
		Уменьшите температуру промывочного раствора до 73ºC
	Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, и зонд не достиг места назначения	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда
	Недостаточное количество гибридизационного раствора для среза	Увеличьте количество гибридизационного раствора до 20 мкл на один срез
	Неправильная обработка протеазой	Убедитесь в том, что температура водяной бани составляет 37 ± 1ºC
	Длительная фиксация среза (разъединение клеток)	Убедитесь в том, что pH буферного раствора составляет 1.0 ± 0.2
	Потеря ДНК (плохая окраска DAPI)	Увеличьте продолжительность обработки протеазой с прибавкой по 5 минут.
		Оптимальное время фиксации микропрепаратов, залитых парафином, составляет 1 – 2 суток. Более длительная фиксация приводит к прогрессирующему уменьшению интенсивности сигнала.
Изменение интенсивности	Вариант нормы	Если проблемные зоны хорошо окрашены DAPI, микропрепарат

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сигнала в срезе	Из-за попадания пузырьков воздуха под покровное стекло зонд распределен по микропрепарату неравномерно Слишком большой срез	можно использовать для подсчета ядер. Повторите гибридизацию на следующем смежном срезе или на том же микропрепарате и убедитесь в том, что под покровное стекло не попали пузырьки воздуха. Для больших срезов увеличьте объем гибридизационног раствора до20 мкл.
Фоновые помехи	Несоблюдение условий промывания	Убедитесь в том, что pH промывочных растворов I и II составляет 7.0 – 7.5, в противном случае, утилизируйте раствор. Убедитесь в том, что температура промывочного растворасоставляет 73 - 75ºC Во время промывания перемешивайте растворы Увеличьте температуру промывочного раствора до 75ºC Увеличьте продолжительность промывания до 5 минут
Потеря ткани или нарушение ее морфологии	Длительная фиксация среза (плохое окрашивание DAPI) Неподходящие микропрепараты Неправильная сушка микропрепаратов Чрезмерная предварительная обработка Чрезмерная денатурация При удалении покровного стекла после гибридизации произошло	Убедитесь в соблюдении продолжительности и условий фиксации ткани Используйте положительно заряженные предметные стекла Убедитесь в том, что температура воздушного термостата составляет 56ºC Убедитесь в том, что температура раствора для предварительной обработки составляет 80 ± 1ºC Уменьшите продолжительность предварительной обработки Уменьшите продолжительность обработки протеазой
Низкая специфичность CEP 7(зеленого) сигнала	Несоблюдение условий промывания	Увеличьте температуру промывочных растворов до 75ºC Удалите покровное стекло и промойте микропрепарат еще раз

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБИЛИОГРАФИЯ:

1. Parkin MD. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-43.
2. Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. Cancer Statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47.
3. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, et al. Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *J Clin Oncol* 2006;21(20):3798-807.
4. 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.
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.

Техническая помощь:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis EGFR/CEP7 FISH Probe Kit и другие многочисленные, меченые ДНК-пробы осуществляется на основании европейского патента № 5,663,319 и 5, 491, 224 приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929, и 6, 607б 877, приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange и HYBrite являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2008, 2020 Abbott. Все правазащищены
www. abbottmolecular.com
Июнь 2020
30-608213/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

en

REF 01N36-020

30-608222/R3

Vysis LSI PML/RARA Dual Color,
Dual Fusion Translocation Probe Set

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-15°C -25°C	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначен для выявления транслокации (15;17) (q22;q12-21), которая появляется при слиянии генов PML/RARA.

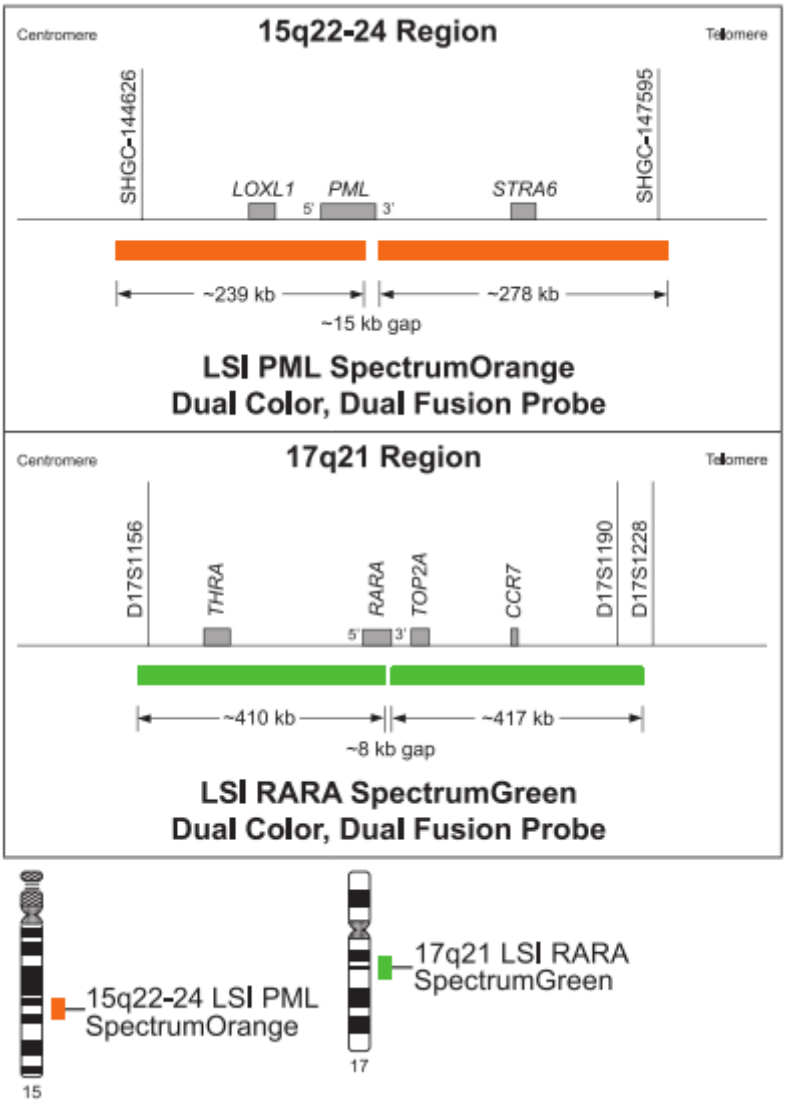
ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ И ПОЯСНЕНИЕ

У большинства пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом выявляется транслокация (15;17)(q22;q12-21), которая приводит к слиянию гена промиелоцитарного лейкоза (PML) участка 15q22 с геном гена альфа-рецептора ретиноевой кислоты (RARA) участка 17q12-q21[1]. При наличии слияния генов эффективна политрансретиноевая кислота[1]. В нескольких исследованиях набор двухцветных зондов двойного слияния для выявления транслокации LSI PML/RARA использовался для выявления слияния генов PML/RARA. Brockman и др.[2] использовали набор зондов для изучения костного мозга 30 здоровых людей, 33 пациентов с нелеченным острым промиелоцитарным лейкозом, 14 пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом, получающих лечение, и 5 пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом с известными вариантами транслокаций. Набор зондов использовали и другие исследователи, в т.ч. Yin и др.[3]и Moon и др.[4]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание зонда

Набор двухцветных зондов двойного слияния для выявления транслокации LSI PML/RARA представляет собой смесь зондов SpectrumGreen RARA и SpectrumOrange PML. Длина зонда LSI RARA составляет около 700 килобаз; он перекрывает ген RARA. Длина зонда LSI PML составляет около 530 килобаз; он перекрывает ген PML. Зонд LSI PML имеет гэп размером 15 килобаз.



РЕАГЕНТЫ

1. Набор двухцветных зондов двойного слияния для выявления транслокации Vysis PML/RARA (серия № 30-191013) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 650 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Условия хранения

Зонд Vysis LSI PML/RARA **двойного слияния** следует хранить при температуре не выше -20ºC (±15°C) в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия транспортировки
Во время транспортировки зонд Vysis PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Kit транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**
Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство [6]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).
Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа

Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Набор двухцветных зондов двойного слияния для выявления транслокации Vysis PML/RARA
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипеттор (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.

1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.

3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).

ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.

ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.
Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[3]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Ожидаемые результаты

Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью набора двухцветных зондов двойного слияния для выявления транслокации Vysis PML/RARA приведет к появлению двух оранжевых и двух зеленых сигналов(202G). В ядре, содержащем простую транслокацию (15;17) – слияние генов PML/RARA, будет наблюдаться одно зеленое (нормальная аллель RARA), одно оранжевое (нормальная аллель PML) и два оранжевых/зеленых слияния, der(15) и der(17). Используя набор зондов, Brockman и др. наблюдали такую картину при тройной транслокации (15;17;19), а в образце с транслокацией (11;17) – 2 оранжевых, 1 зеленый и 2 ослабленных зеленых сигнала. При изучении других патологических образцов можно получить другие результаты. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[5], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

некоторое время после денатурации.	нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºС) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºС). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Grimwade D, reviewer. Br J Haematol. 1999;106:591-613. Review of: *The Pathogenesis of Acute Promyelocytic leukaemia: Evaluation of the Role of Molecular Diagnosis and Monitoring in the Management of the Disease*.
2. Brockman BR, Paternoster SF, Ketterling RP, et al. New Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization Method to Detect PML/ RARA Fusion in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003;145:144-151.
3. Yin CC, Glassman AB, Lin P, et al. Morphologic, Cytogenetic, and Molecular Abnormalities in Therapy-Related Acute Promyelocytic Leukemia. *AM J Clin Pathol* 2005;123:840-848.
4. Moon HW, Chang YH, Kim TY, et al. Incidence of Submicrosopic Deletions Vary According to Disease Entities and Chromosomal Translocations in Hematologic Malignancies: Investigation by Fluorescence In Situ Hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007;175:166-168.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set разрешены на основании европейского патента 5, 663, 319, и 5, 491, 224 приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI зонды прямо меченые флурохромами, защищены американскими патентами RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, приписанного [1] Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

ThermoBrite является торговой маркой компании Сэмпл Процесснг Инк. (Sample Processing, Inc.).

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

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2007, 2020 Abbott Laboratories
www. abbottmolecular.com
30-608222/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI BCR/ABL, Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

en

REF 08L10-001

30-608202/R5

Vysis LSI BCR/ABL, Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

08L10-001

30-608202/R5

Изменения выделены

Используемые символы

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер лота
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±5°C)
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Биологический риск
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Использовать до (срок годности)
	См. инструкцию по применению
	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения t(9;22)(q34;q11.2) и комплекса или маскированных вариантов t(9;22) которые приводят к слиянию генов BCR/ABL. Данная проба может быть использована в отношении хромосом в метафазе или ядер в интерфазе.

Краткое описание тестирования

Филадельфийская хромосома (Ph) обусловленная реципрокными t(9;22)(q34;q11.2) является отличительным признаком почти всех случаев хронического миелолейкоза (ХМЛ). Она также встречается в некоторых случаях острого лимфолейкоза, в которых она ассоциирована с плохим прогнозом[1]

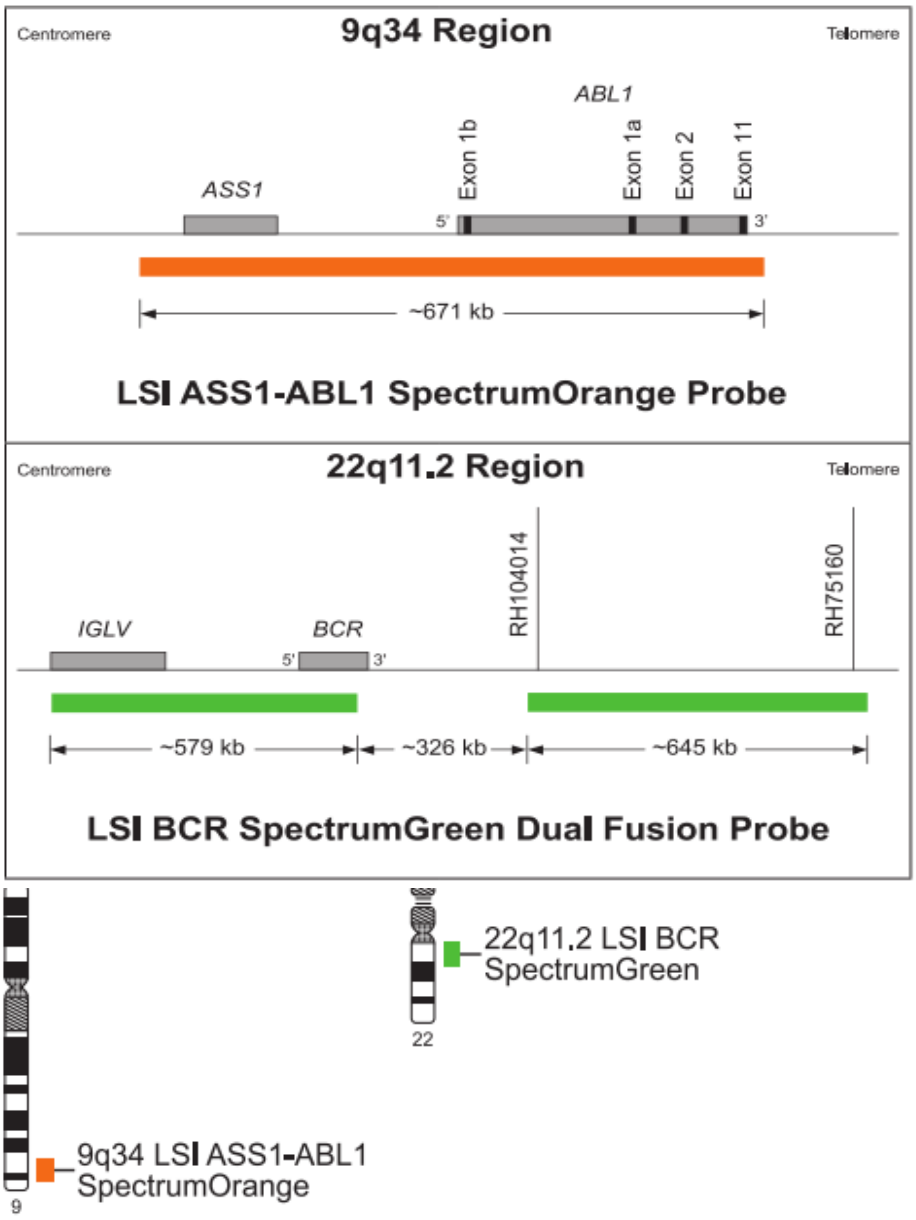
Филадельфийская хромосома редко обнаруживается при других лейкозах. Критическим молекулярным последствием t(9;22) является формирование химерного гена BCR/ABL (область локализации инициации сайта реаранжировки/вирус мышиного лейкоза Абельсона 1) производного хромосомы 22 (филадельфийской). Данный химерный ген отвечает за выработку тирозин киназы, которая является постоянной активной, в отличие

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

от высоко отрегулированной нормальной ABL киназы[2]. В 5 - 10% пациентов с ХМЛ, слияние гена BCR/ABL происходит в отсутствие цитогенетически определяемой филадельфийской хромосомы, в результате более комплексной реаранжировки[3]

Описание пробы

Примерно 671 килобаз SpectrumOrange™ ABL проба протягивается от точки центромеры аргиносукцинат синтазы (ACC) до теломеры гена ABL 9 хромосомы. Проба SpectrumGreen™ BCR захватывает геномное расстояние примерно в 1.5 м.н. Она начинается в пределах вариабельных сегментов локуса IGL 22 хромосомы и заканчивается в точке 900 килобаз теломеры гена BCR. 300 килобаз теломеры гена BCR не присутствует в пробе. Обе пробы BCR и ABL захватывают типичные области локализации хромосом t(9;22) соответствующих генов.



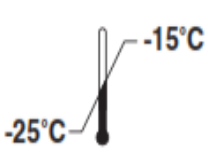
Реагенты

1. Vysis LSI BCR/ABL двухцветный, Набор пробы транслокации двойного слияния (Серия. 31-191032)

(1 пробирка, 50 мкл/пробирку). 675 нг/мкл. Флуорофор-маркированная пробы ДНК и блокирующий ДНК в трис-ЭДТА буфер.

2. Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации (Серия 30-805826) (1 пробирка, 375 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



The Vysis LSI BCR/ABL двухцветный, Набор пробы транслокации двойного слияния и Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C и ниже, в защищенном от света месте.

Меры предосторожности

IVD In Vitro диагностическое медицинское устройство

Для диагностики In Vitro.

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничиваются следующим:

- Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не пользуйтесь косметикой и не дотрагивайтесь до контактных линз в помещениях, где производятся работы с этими материалами.
- Вытирайте и дезинфицируйте все места, куда попадают капли образцов, туберкулецидным дезинфецирующим средством, например, 1,0% натрия гипохлорита, или другим соответствующим дезинфецирующим средством.[7]
- Деконтаминируйте и утилизируйте все потенциально все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными и государственными законами.[10]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360	Может причинить вред плоду ребенка в утробе матери
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

Приготовление Реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор

Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)

Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)

Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC / 0,3% NP-40 промывочный раствор

Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: Зонд LSI ДНК должен храниться при температуре не выше -20ºC (±5 °C) в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требуется свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к Анализу

Клетки костного мозга культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика

Необходимые материалы:

- Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипет-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в этой инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата образца-мишени

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца-мишени):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Для зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК

Гибридизация Зонда и Образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру – поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи резинового клея изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка Стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4X SSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий диапазон показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей этой инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Hyb Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[6]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Предполагаемые результаты

Наборы ядер или хромосом в метафазе без слияния гена BCR/ABL должны давать 2 оранжевых (нормальная хромосома 9) и 2 зеленых (нормальная хромосома 22) сигналов. Простые реципрокные транслокации без значительных потерь центромер или теломер ДНК дают 1 оранжевый (нормальная хромосома 9), 1 зеленый (нормальная хромосома 22), и 2 оранжевых/зеленых или желтых сигналов слияния (1 на каждую аномальную 9 и 22 хромосомы). При более комплексных аномалиях, включая случаи делеции центромер ДНК, могут наблюдаться другие рисунки сигналов. Особенно в случаях атипичных рисунков интерфазной FISH, при интерпретации результатов может оказаться полезным анализ метафазной FISH[4,5].

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена путем утилизации соответствующих контролей и аналитических техник наряду с учетов других клинических и диагностических данных тестирования[4,6].

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте температуру плавления. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/раствора для денатурации 2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Hold Temp при температуре 73ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH-методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе пробоподготовки были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь, что pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Для визуализации гибридизации использованы длиннополосные пропускные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многопропускные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH-методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза (trypsin-Giemsa)) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте только такое количество срезов, которое сможете исследовать и соблюдайте должную температуру и временные промежутки в соответствии с данной методикой исследования.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи резинового клея , не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с этой инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH – метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель. Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров.	Многополосные пропускные фильтры дают меньше света, чем однополосные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многополосных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (Номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Библиография

1. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986;67:415-20.
2. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* Oncogene Products. *Science* 1990; 247:1079-82.
3. Chase A, Huntley BJ, Cross NC. Cytogenetics of chronic myeloid leukemia. *Best Prac Res Clin Haematol* 2001;14(3):553-71.
4. Dewald GW. Interphase FISH studies of Chronic Myeloid Leukemia. In: Fan YS, ed. *Methods in Molecular Biology, Vol 204: Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2002:311-42.
5. Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization
(FISH) in BCR/ABL leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia* 2003;17:1124-29.
6. 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.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. 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.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Использование двухцветных зондов для перегруппировки Vysis LSI или Dual Color, Break защищены европейским патентом № 5, 491, 224 B1, назначенным Калифорнийским университетом и распространяется исключительно на Эбботт Molecular Inc. Использование зондов Vysis LSI также охватывается европейскими Патентом № RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696, 6, 280, 929 и 6, 607, 877, присвоенным Йельским университетом и распространяется исключительно на Эбботт Molecular Inc.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold, HyBrite, CEP, LSI, WCP и Vysis являются зарегистрированными товарными знаками группы компаний различной юрисдикции Abbott.

Термобрайт это торговая марка Ирис Сэмпле Прцессинг, Инк.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2006, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
Март 2020
30-608202/R5

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe Set

en

REF 08L55-020

30-608204/R6

Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe Set
REF 08L55-020
30-608204/R6

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Биологический риск
	Опасность
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения t(9;22)(q34;q11.2) и комплекса или максированных вариантов t(9;22) которые приводят к слиянию генов BCR/ABL. Данная проба может быть использована в отношении хромосом в метафазе или ядер в интерфазе.

Объяснение и назначение теста

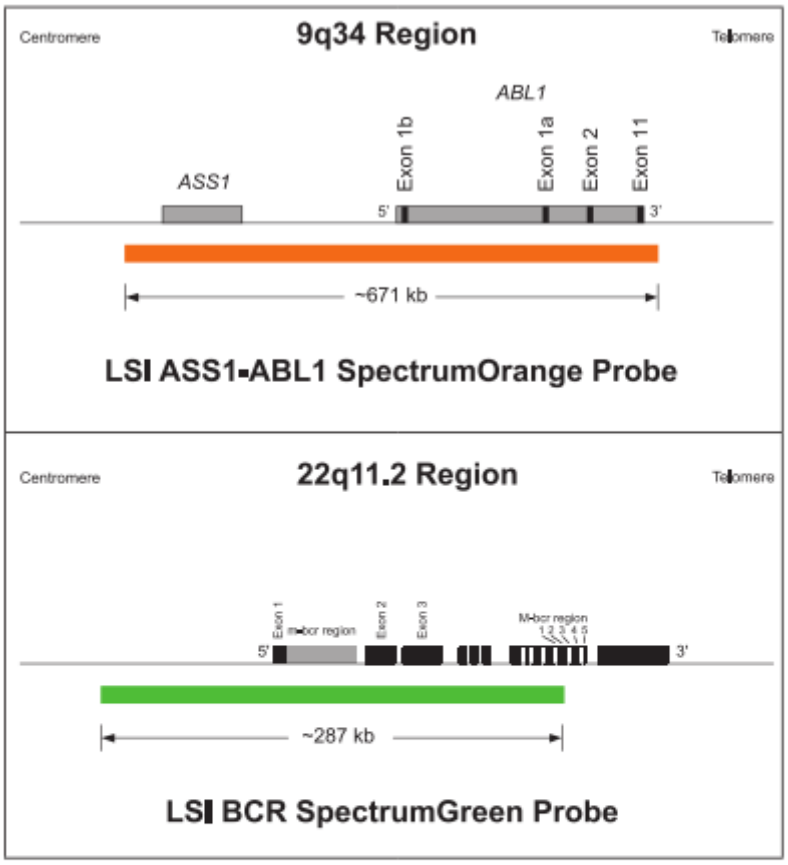
Филадельфийская хромосома (Ph) обусловленная реципрокными t(9;22)(q34;q11.2) является отличительным признаком почти всех случаев хронического миелолейкоза (ХМЛ). Она также встречается в некоторых случаях острого лимфолейкоза, в которых она ассоциирована с плохим прогнозом[1]. Филадельфийская хромосома редко обнаруживается при других лейкозах. Критическим молекулярным последствием t(9;22) является формирование химерного гена BCR/ABL (область локализации инициации сайта реаранжировки/ вирус мышиного лейкоза Абельсона 1) производного хромосомы 22 (филадельфийской). Данный химерный ген отвечает за выработку тирозин киназы, которая является постоянной активной, в отличие от высоко отрегулированной нормальной ABL киназы.[2]

В 5-10% пациентов с ХМЛ, слияние гена BCR/ABL происходит в отсутствие цитогенетически определяемой филадельфийской хромосомы, в результате более комплексной реаранжировки[3].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Примерно 671 килобаз SpectrumOrange™ ABL1 проба протягивается от точки центромеры аргиносукцинат синтазы (ACC) до теломеры гена ABL1 9 хромосомы. Проба SpectrumGreen™ BCR начинается между экзонами 13 и 14 (главная точка разрыва кластерного региона M-bcr экзонов 3 и 4) и тянется к центромере 22 хромосомы на расстояние приблизительно 287 килобаз. Обе пробы BCR и ABL захватывают типичные области локализации хромосом t(9;22) соответствующих генов. Проба BCR перекрывает ожидаемые M-bcr точки разрыва, но захватывает минимальные точки разрыва кластерного региона (m-bcr) для t(9;22)(q34;q11.2).



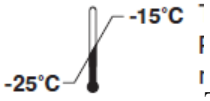
Реагенты

1. Vysis LSI BCR/ABL ES двухцветный, Набор пробы транслокации двойного слияния (Серия. 30-191022) (1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 250 нг/мкл. Флуорофор-маркированная пробы ДНК и блокирующая ДНК в трис-ЭДТА буфер.

2. Vysis LSI/WCP ®Буфер гибридизации (Серия 30-804826) (1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Инструкции по хранению



The Vysis LSI BCR/ABL ES двухцветный, Набор пробы транслокации двойного слияния и Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Меры предосторожности

IVD Предназначен только для диагностики in vitro

Только для диагностического использования *In Vitro*.

Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[7], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[8], CLSI документ M29-A3[9], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[10].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[7]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[10]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

Приготовление Реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: **там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.**

20X SSC раствор
Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.
2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)
Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.
Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.
0,4X SSC / 0,3% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.
Хранение LSI ДНК зонда: Зонд LSI ДНК должен храниться при температуре не выше -20ºC (±5 °C) в защищенном от света месте.
Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требуется свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.
Сбор образцов и подготовка к Анализу
Клетки костного мозга культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Методика
Необходимые материалы:

Необходимые материалы (в комплекте)
 Зонды Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color
Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипет-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в этой инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата образца-мишени

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца-мишени):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
   1 мкл зонда
   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК

Гибридизация Зонда и Образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру – поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи резинового клея изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка Стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4X SSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Наборы ядер или хромосом в метафазе без слияния гена BCR/ABL должны давать 2 оранжевых (нормальная хромосома 9) и 2 зеленых (нормальная хромосома 22) сигналов. Простые реципрокные транслокации в M-bcr без значительных потерь центромер ABL1 или теломер ДНК дают 1 оранжевый (нормальная хромосома 9), 1 зеленый (нормальная хромосома 22), и 2 оранжевых/зеленых или желтых сигналов слияния (1 на каждую аномальную 9 и 22 хромосомы). При более комплексных аномалиях, включая случаи делеции центромер ДНК в точках разрыва ABL1 ожидается только один оранжевый сигнал. Особенно в случаях атипичных рисунков интерфазной FISH, при интерпретации результатов может оказаться полезным анализ метафазной FISH[5]. Интерпретация результатов FISH должна быть произведена путем утилизации соответствующих контролей и аналитических техник наряду с учетов других клинических и диагностических данных тестирования[4,6].

Проблема	Решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986;67:415-20.
2. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl Oncogene Products. *Science* 1990; 247:1079-82.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Chase A, Huntley BJ, Cross NC. Cytogenetics of chronic myeloid leukemia. *Best Prac Res Clin Haematol* 2001;14(3):553-71.
4. Dewald GW. Interphase FISH studies of Chronic Myeloid Leukemia. In: Fan YS, ed. *Methods in Molecular Biology, Vol 204: Molecular*
Cytogenetics: Protocols and Applications. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2002:311-42.
5. Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in BCR/ABL leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia* 2003;17:1124-29.
6. 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
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Использование Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set или других проб Vysis осуществляется на основании американского патента 5, 663, 319 и 5, 491, 224 , назначенного Abbott Molecular. Использование Vysis LSI проб прямого мечения осуществляется на основании американских патентов RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696 и 6,280,929 и 6, 607, 877 приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются зарегистрированными торговыми марками компании
Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.).

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2006, 2020 Abbott. Все права защищены

www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608204/R6

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Set

en

REF 08L56-050

30-608205/R4

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color,
Single Fusion Translocation Probe Set
REF 08L56-050

30-608205/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
-15°C -25°C	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

Назначение

Флюоресцентная in situ гибридизация (FISH) зонда предназначена для определения слияния генов BCR/ ABL в результате T (9; 22) (q34 ; q11.2) или других хромосомных перестроек. Зонд может быть использован с хромосомами в метафазе или интерфазных ядрах.

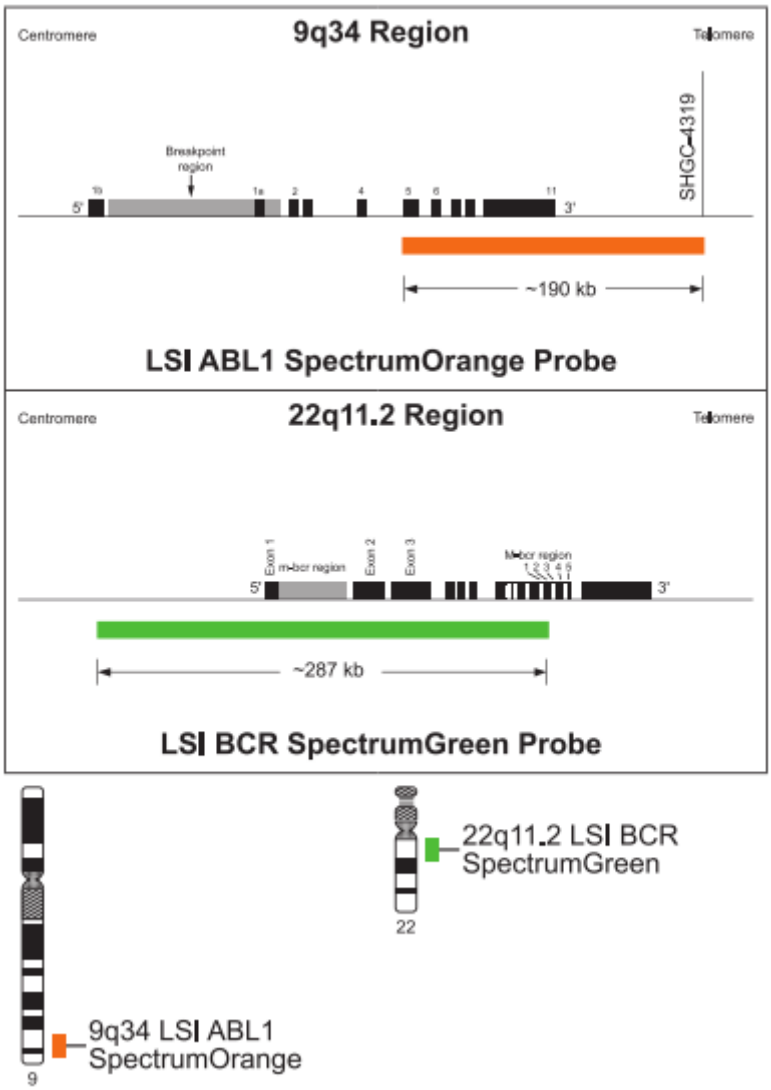
Краткое описание и разъяснения

Филадельфийская хромосома (Ph) получается путем реципрокной транслокации (9 ;22) (Q34 ; q11.2) и является отличительной чертой почти всех случаев хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ). В некоторых случаях она встречается у детей и взрослых при остром лимфобластном лейкозе, которая связана с плохим прогнозом. Ph-хромосома наблюдается редко при других лейкозах. Критическим молекулярным следствием транслокации (9, 22), является образование химерных BCR/ABL (контрольная точка области кластера/мышиный лейкоз Абельсона вирусный онкоген 1) генов на хромосоме 22, производное (Ph-хромосомы). Этот химерный ген производит тирозинкиназу, которая является конститутивной в отличие от нормальной регулятивной ABL киназы[2]. У 5 до 10% пациентов с ХМЛ, происходит слияние генов BCR/ABL в отсутствие цитогенетически обнаруживаемой Ph-хромосомы как результат более сложных перестроек[3].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание зонда

Зонд SpectrumOrange ABL1 тянется от точки между ABL1 экзоны 4 и 5 и простирается примерно на 190 кб в направлении теломеры 9q. Этот целевой зонд фланкирует предполагаемую хромосому 9 в точке транслокации (9; 22) (q34 ;q11.2). Зонд SpectrumGreen BCR начинается между BCR экзонами 13 и 14 (основная точка останова кластера область [M-BCR] экзонов 3 и 4) и продолжается до центромерной области хромосомы 22 и имеет длину примерно 287 кб. Зонд BCR фланкирует ожидаемые M- BCR контрольные точки, но охватывает незначительные точки останова кластера область (м-BCR) для транслокации (9; 22) (q34 ; q11.2).



Реагенты

1. Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Set (Part No. 30190022) (1 флакон, 20 мкл флакон). 250 нг/мкл. Флуорофор-меченый ДНК-зонд и блокиратор ДНК в Трис-ЭДТА буфере.

2. Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (Part No. 30-804826) (1 флакон, 150 мкл флакон). Декстрансульфат, формамид, SSC (pH 7,0).

Инструкция по хранению

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Set должен хранится при температуре - 20° C (± 5°C), в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Для диагностического использования in vitro**

Только для диагностики in vitro

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Set

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[5], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[6], CLSI документ M29-A3[7], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[8].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[5]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить раствор накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте.
Распадаемость: Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к анализу
Клетки костного мозга или периферической крови культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

Методика
Необходимые материалы
• Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Set
• Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Необходимые материалы (не в комплекте)
● 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
● 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
● Стеклянные сосуды Коплина
● Калиброванный термометр
● Пинцет
● Градуированный цилиндр 1000 мл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Магнитная мешалка
● Этанол
● Микроцентрифуга
● Микродозаторы (1 – 10 мкл)
● Пипетка (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85% раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре.
Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационным раствором оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.
1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.
ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.
3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).
ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. Доведите зонд до температуры окружающей среды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73 ±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.
ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45-50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3% NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73 ±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 2X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0,1% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
2. Опустите микропрепарат в раствор 2XSSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
3. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
4. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для образцов, залитых парафином, установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[4], а также с учетом других клинических и диагностических данных[8]. Индивидуальные лаборатории должны устанавливать аналитически нормальное пороговое значение для атипичных сигналов.

Предполагаемые результаты

Ядра или метафазные хромосомы, лишенные гена BCR/ABL, как ожидается, обладают двумя оранжевыми (нормальная хромосома 9) и двумя зелеными (нормальная хромосома 22) сигналами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ожидаемый сигнал слияния 1 гена BCR/ABL это 1 оранжевый (нормальная хромосома 9), 1 зеленый (нормальная хромосома 22), и 1 оранжевый/зеленый или желтый фьюжн (аномальные хромосомы 22). Интерпретация результатов FISH должна быть сделана с использованием соответствующих контрольных и аналитических методов[4], а также с учетом других данных клинических и диагностических тестов.

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру гибридизации. • Увеличьте температуру плавления. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Hold Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH-методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе подготовки пробы были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения среза в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что pH и температура раствора требуемые значения. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы пропускные длиннополосные фильтры,	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многополосные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH методики.
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH методике (обработка трипсином и красителем Гимза (trypsin-Giemsa) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (Vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте только такое количество срезов, сколько сможете исследовать и соблюдайте требуемые значения температуры и времени в соответствии с методикой исследования.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом. При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи резинового клея , не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH – метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0,1% NP-40

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Флуоресцентный краситель слишком яркий.	при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров	Многополосные фильтры дают меньше света, чем однополосные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многополосных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с данной инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с данной инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (Номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986;67:415-20.
2. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* Oncogene Products. *Science* 1990; 247:1079-82.
3. Chase A, Huntley BJ, Cross NC. Cytogenetics of chronic myeloid leukemia. *Best Prac Res Clin Haematol* 2001;14(3):553-71.
4. 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.
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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.
ThermoBrite является торговой маркой группы компаний Sample Processing.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

CE

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2006, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608205/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/LSI ARSA SpectrumGreen Probe Set

en

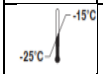
REF 08L59-020

30-608221/R4

Vysis LSI TUPLE1 (HIRA)
SpectrumOrange/LSI ARSA
SpectrumGreen Probe Set
REF 08L59-020
30-608221/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±5°C)
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения делеции области гена TUPLE1 (HIRA) хромосомы 22q11,2 в метафазе.

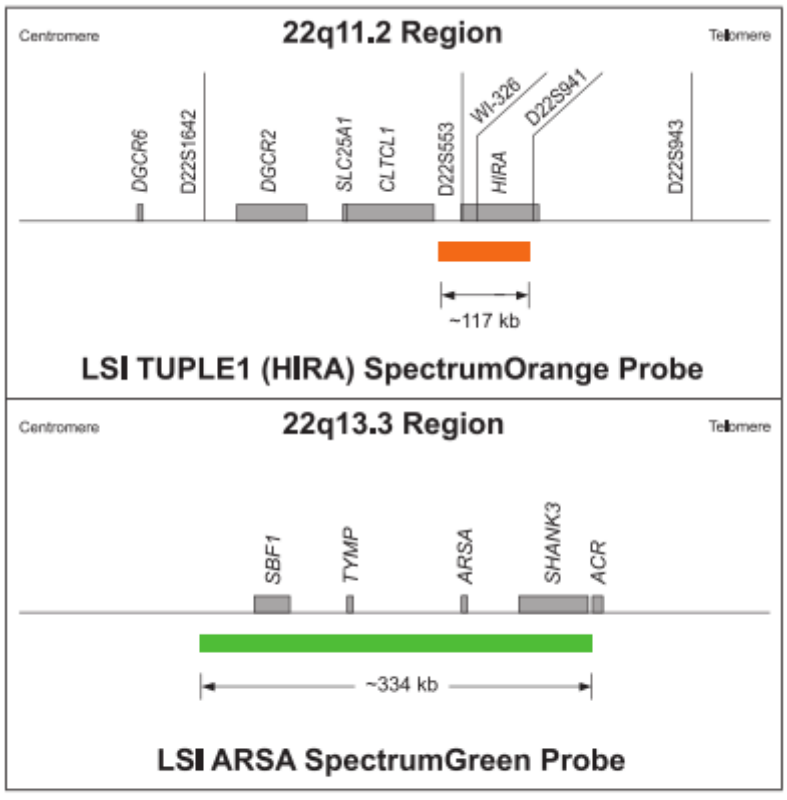
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ТЕСТИРОВАНИЕ

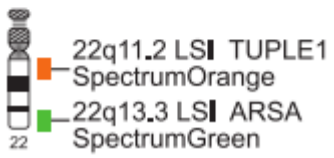
Большинство случаев синдрома ДиГеорге или велокардиофациального синдрома (DGS/VCFS) ассоциированы с гемизиготной хромосомной делецией 22q11,2 в 1,5-3,0 мегабаз. Считается, что данные делеции регулируются присутствием повторов копий, специфичных для 22 хромосомы.1

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Специфический идентификатор локуса Vysis (LSI) TUPLE1 (HIRA)/ LSI ARSA содержит оранжевую пробу TUPLE1 (TUP-подобный усилитель расщепленного белка 1) или HIRA [HIR дефективный гомолог регуляции клеточного цикла гистонов A (S. cerevisiae)] области гена с распространенной областью делеции DGS/VCFS. Набор проб также включает зеленую пробу, чьей целью является область гена ARSA (арилсульфатаза A) локализованного около теломеры 22q. При гемизиготной делеции области DGS/VCFS, оранжевый сигнал TUPLE1 (HIRA) будет отсутствовать в гомологе хромосомы 22 с делецией.
Набор пробы LSI TUPLE1(HIRA)/ LSI ARSA широко используется для определения делеций области DGS/VCFS. Park и коллеги2 сообщил о сердечнососудистых аномалиях, наблюдаемых у 222 пациентов с подтвержденными делециями 22q11.2, которые были определены с помощью гибридизации с использованием данного набора проб на периферических лимфоцитах. Набор проб LSI TUPLE1 (HIRA)/ LSI ARSA был также использован Yakut и коллегами3 для идентификации делеций 22q11.2 хромосом в метафазе 5 из 43 пациентов с подозрением на DGS/VCFS. Manji и коллеги4 использовал данный набор проб для демонстрации делеций 22q11.2 у 5 из 46 ,плодов с сердечными дефектами и нормальным кариотипом. В последнее время, микродупликация области DGS/VCFS была определена с использованием набора проб LSI TUPLE1 (HIRA)/ LSI ARSA с ядрами в интерфазе у пациентов с перекрестными характеристиками DGS/VCFS56.

Описание пробы
Цель гибридизации 22q11.2 117 т.н. SpectrumOrange LSI TUPLE1 (HIRA) пробы протягивается с 87 т.н. центромеры до гена HIRA к точке в пределах 13 т.м. от конца теломеры. Цель 334 т.н. SpectrumGreen ARSA пробы начинается с центромеры гена SBF1 и заканчивается в точке между генами SHANK3 и ACR (22q13.3). В марте 2006 ассамблея человеческого генома, проба TUPLE1 (HIRA) покрывает основные пары с 17,669,001 по 17,785,903 и проба ARSA охватывает пробы с 49,187,176 по 49,520,735 22 хромосомы.





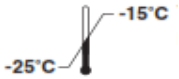
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/LSI ARSA Spectrum Green (Серийный номер 30-191028) (1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 475 нг/мкл Флуорофор-маркированная проба ДНК и ДНК блокированная в трис-ЭДТА.

2. Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации (Серийный номер 30-804826) (1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ



Проба Vysis LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/LSI ARSA Spectrum Green Probes должна храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**

Vysis LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/LSI ARSA Spectrum Green

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел молекулярно-технического обслуживания компании Эбботт (Abbott).

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[9], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[10], CLSI документ M29-A3[11], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[12].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[9].

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[12].

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Приготовление реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: Измерьте pH данных растворов при комнатной температуре. Используйте pH метр с стеклянным электродом.

20X SSC Раствор
Тщательно перемешайте 132г 20X SSC в 400 мл очищенной H_2O. Измерьте pH и отрегулируйте его до 5.3 с помощью HCl. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести объем до 500 мл. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор после 6 месяцев использования, или ранее при помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0.1% NP-40 Отмывочный раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC (pH 5.3) и 850 мл очищенной H_2O. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Отмерьте pH и отрегулируйте pH 7.0±0.2 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O чтобы довести финальный объем до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте основной раствор по прошествии 6 месяцев, или ранее при помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид / 2X SSC)
Тщательно перемешайте 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной H_2O в стеклянном сосуде Коплина. Измерьте pH с использованием индикаторных полосок, для того, чтобы убедиться, что он составляет 7.0-8.0. Между использованиями, хранить накрытым при температуре 2-8°C. Утилизировать после 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Приготовьте разведения 100% этанола очищенной H_2O. Между использованиями, хранить накрытым при комнатной температуре. Утилизировать через 6 месяцев.

0.4X SSC / 0.3% NP-40 отмывочный раствор для быстрой отмывки
Тщательно перемешайте 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной H_2O. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и отрегулируйте pH до 7.0-7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную H_2O для того, чтобы довести общий объем раствора до 1 литра. Хранить при комнатной температуре. Утилизировать основной раствор после 6 месяцев, или ранее, при помутнении или загрязнении раствора.

Хранение пробы ДНК LSI: Проба ДНК LSI должна храниться при температуре -20°C или ниже, в защищенном от света месте. **Распадаемость:** Флуорофоры обесцвечиваются при экспозиции свету. Для ограничения распада, храните все растворы и препараты, содержащие флуорофоры в защищенном от света месте. Производите все шаги, которые не требуют света, такие как инкубации и отмывки, в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание относительно методики: До использования, оттайте реагенты при комнатной температуре, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с использованием стандартной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка анализа
Клетки костного мозга и периферической крови должны быть культивированы, фиксированы, и помещены на микроскопические препараты в процессе стандартных цитогенетических процедур.

Методика
Требуемые материалы
- Vysis LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/LSI ARSA Spectrum Green Probe Set
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Требуемые, но не предоставляемые материалы
- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1 - 10 мкл
- Микродозатор объемом 1 - 10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные микроскопические стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- 37°C инкубатор
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид,
- Краситель DAPI II
- Сушка препаратов

Приготовьте 3 сосуда Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в 1 сосуд; 70 мл 85% EtOH в другой, и 70 мл 70% EtOH в последний. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать после 7 дней или при избыточном разведении или испарении.
Для хороших результатов, убедитесь в том, что реагенты созданы и использованы при температуре, указанной в данной инструкции.
Измерьте температуру растворов в сосудах Коплина; если требуется, используйте калиброванный термометр.
При проведении гибридизации проб CEP® и LSI, следуйте общему методу LSI для определения протокола качества реагентов.

Приготовление целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: **Возьмите сосуды Коплина, содержащие раствор для денатурации, и доведите их до комнатной температуры. Поместите сосуды на водяную баню температурой 73±1°C на 30 минут перед использованием.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: **Погружайте не более, чем 4 препарата одновременно.**

3. Высушите препараты в течение 1 минуты в 70% EtOH, затем в течение 1 минуты в 85% EtOH, затем 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выдерживайте препараты в 100% EtOH до тех пор, пока вы готовы высушить все препараты и взять смесь проб.

Приготовление пробной смеси

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести комбинированный объем пробы и воды до 3 мкл.**

2. Центрифугируйте пробирку 1-3 секунды.
3. Поместите в вихревую мешалку и центрифугируйте.
4. Поместите пробирки на водяную баню при температуре 73 ± 1°C в течение 5 минут.
5. Уберите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C до применения пробы целевой ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: **Если препараты готовы когда проба денатурирована, вы можете немедленно применить пробу к целевой ДНК.**

Гибридизация пробы на целевом образце

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную коробку путем помещения увлажненного бумажного полотенца на стороны воздухонепроницаемого контейнера. Пометите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Уберите препараты из 100% EtOH.
2. Высушите препараты путем касания нижнего края препаратов блоттера, и вытирая нижнюю часть препаратов бумажным полотенцем.
3. Поместите препарат на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C для испарения EtOH.
4. Примените 10 мкл пробной смеси к 1 целевой области и немедленно накройте покровным стеклом. Повторите для дополнительных целевых областей.
5. Закрепите покровное стекло.
6. Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите коробку в инкубатор при температуре 37°C на 6-16 часов. Для проведения количественного определения с достаточным сигналом, начните с 12-16 часовой гибридизации большинства проб LSI.

Отмывка препаратов: Методика быстрой помывки

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов в виде парафиновых срезом, замените 2X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 отмывочный раствор.

Подготовьте отмывочные растворы:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуд Коплина. Поместите сосуд в воду при температуре 73±1°C на, по крайней мере, 30 минут перед использованием. Используйте сутки, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуд Коплина. Используйте при комнатной температуре. Используйте сутки, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания нужной температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, одновременно отмойте 4 препарата. Если у вас меньше, чем 4 препарата, добавьте пустые препараты при комнатной температуре, чтобы получилось 4 штуки.

Засеките время погружения четвертого препарата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1 – 3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73 ±1ºC.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.

2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флюорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флюорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флюорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флюорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флюорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флюорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация это процесс, который упрощает флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) путем комбинирования денатурации пробной смеси и образца в один шаг. Обычно, коденатурация производится путем помещения препаратов образцов с пробами и покровными стеклами, на поверхность горячей тарелки или полку печи или инкубатора при температуре денатурации. Обычно, после 2-10 минут, препараты удаляют и помещает в инкубатор при температуре гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации определяют широкий спектр температур и временных периодов, что отражает необходимость в оптимизации условий для специфического предназначения и типов образцов. Описанные параметры используются с системной денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™ и предназначены обеспечить ряд стартовых параметров. Дальнейшая оптимизация может понадобиться в зависимости от образца. Появление гибридизации с использованием коденатурации может варьироваться от гибридизации с денатурацией целевого образца и его дегидратации до начала пробы.

Подготовка препарата к коденатурации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Добавьте следующие ингредиенты к каждой целевой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Буфер для гибридизации
1 мкл пробы
2 мкл очищенной H_2O

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации 3 проб, маркированных разным флуорофором, 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную H2O для доведения комбинированного объема пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Перемешайте и затем снова центрифугируйте.
4. Добавьте 10 мкл пробной смеси к препарату и накройте покровным стеклом.
5. Закрепите покровное стекло.

Установка параметров системы гибридизации/денатурации

Направления, приведенные ниже, предназначены для сиостемы гибридизации/денатурации HYBrite™. См. Инструкцию пользователя для большей информации об использовании данного инструмента.

Система денатурации/гибридизации ThermoBrite™ может также быть использована, и была продемонстрирована как термически сопоставимая с системой HYBrite. При использовании системы ThermoBrite, может понадобиться лучший контроль данного инструмента (±1°C) для регулирования условий денатурации и гибридизации. Для дальнейшего руководства, пожалуйста, используйте раздел по устранению неисправностей данной инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 1 минуту. Для образцов в парафине, установите температуру плавления на 73°C и время плавления на 5 минут.
2. Установите температуру гибридизации на 37°C и время гибридизации на 4 часа или на ночь.
3. По завершении времени гибридизации, отмойте препараты с использованием методики быстрой помывки.
4. Высушите препараты на воздухе в темноте.
5. Добавьте 10 мкл красителя в целевую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

Для образцов пациентов должны быть использованы положительные и отрицательные контроли.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Интерпретация результатов FISH должна производиться с использованием соответствующих средств контроля и аналитических методов, а также принимая во внимание другие данные клинических и диагностических исследований[8]. Отдельные лаборатории должны установить аналитически нормальный порог для интересующего паттерна атипичного сигнала.

Ожидаемые результаты

В нормальной хромосоме в метафазе, гибридизированной с помощью набора проб LSI TUPLE1 (HIRA) SpectrumOrange/ LSI ARSA SpectrumGreen, обе хромосомы 22 должны давать оранжевый сигнал на 22q11.2 и зеленый сигнал на 22q13.3. В хромосоме в метафазе с гемизиготной делецией области TUPLE1 (HIRA), 1 хромосома 22 должна давать оранжевые и зеленые сигналы, в то время как другая 22 хромосома не будет давать оранжевый сигнал, а будет давать лишь зеленый.

Устранение неисправностей в отношении результатов количественного определения коденатурации

Морфология хромосомы, наблюдаемая во время гибридизации с применением коденатурации, может отличаться от образца, который был денатурирован и дегидрирован до применения пробы.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C.
Тусклая проба	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее: • Увеличьте время гибридизации • Повысьте температуру плавления. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как морфология станет приемлемой. • Отмойте слайд с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 70-73°C.
Диффузный сигнал	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее: • Повысьте температуру 0.4X SSC/0.3% NP-40 на 2°C. При необходимости, продолжайте повышать температуру до того, как интенсивность сигнала станет приемлемой. • Снизьте температуру плавления на 2°C. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Отмойте с использованием 0.4X SSC/0.3% NP-40 при 73-76°C.
Плохая морфология метафазы	Повторите количественное определение на новом образце используя следующее: • Снизьте температуру плавления на 2°C. • Снизьте время плавления • ПРИМЕЧАНИЕ: При необходимости, снижайте температуру плавления или время до тех пор, пока интенсивность сигнала не станет приемлемой. • Предварительно обработайте препараты: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите препарат в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3.Погрузите препарат несколько раз в очищенную воду. 4. Дегидрируйте препараты путем нескольких моек в EtOH длительностью 1 минута (70%, 85%, 100%). 5. Высушите препараты на воздухе и продолжайте приготовления препарата для коденатурации. • Если морфология продолжает оставаться плохой, модифицируйте использование инструмента HYBrite: 1. Приготовьте 280 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации (196 нл формамида/28 нл 2X SSC/56 нл очищенной H2O). 2. Включите программу холодной температуры HYBrite при 73°C. 3. Поместите 10 нл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации в каждую целевую область и накройте покровным стеклом. 4. При достижении HYBrite 73°C, поместите препараты на нагревательную поверхность. Закройте крышку. 5. Удалите препараты через 3 минуты. 6. Удалите покровные стекла. 7. Продолжите шаги по дегидрации в процессе приготовления целевого образца по методике количественно определения коденатурации.

Устранение неполадок

При анализе результатов количественного определения FISH, убедитесь, что ваш микроскоп правильно настроен и оптимально функционирует. В следующей таблице приведены некоторые результаты, которые вы можете получить в процессе выполнения проб LSI. Возможные причины и предложения по улучшению качества процесса приведены ниже.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Искажени е морфолог ии хромосом	Препараты высохли слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани для сушки препаратов. Понизьте температуру сушки во время приготовления. Увеличьте время сушки до ночи при комнатной температуре, затем выдержите по крайней мере

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		24 часа при комнатной температуре. Не сушите препараты при высокой температуре.
	Образец пере-денатурирован.	Убедитесь, что раствор для денатурации был произведен согласно инструкции. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C до погружения препарата, снизьте температуру до 72°C. Уменьшите время погружения препарата в раствор на 1-3 минуты.
	Образца препаратов не до конца высохли перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образцы препаратов до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты сериями моек EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%, 100%).
	Препараты образцов слишком свежие для денатурации.	Выдержите слайды по крайней мере в течение 24 часов при комнатной температуре.
Высокий фон препарата	Стекла не достаточно очищены до приготовления препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите досуха с использованием нетканой бумаги.
	Клеточный детрит.	Отмойте клеточный детрит свежим фиксатором трижды и повторите процедуру.
	Выдерживание метафаз слишком длительное или содержит цитоплазму.	Увеличьте время погружения раствора денатурации до 10 минут.
	Препарат недостаточно отмыт в процессе гибридизации.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что pH и температура отмывочных растворов правильные. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру мойки.
Высокий фон препарата	Отмывочные растворы используются слишком долго или хранятся неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы, содержащие формамид, должны храниться при температуре при 4°C. Утилизировать через 7 дней частого использования. Утилизировать все остальные отмывочные растворы через 1 день. Убедитесь, что pH формамида составляет 7 0.8 0
	Видимая гибридизация с использованием длинных полосных фильтров.	Переключитесь на фильтры с меньшей шириной полос или мультиполосных фильтров для ограничения фонового света.
Слабый сигнал или отсутствие сигнала	Препарат образца неадекватно денатурирован.	Убедитесь, что температура раствора для денатурации в сосуде Коплина составляет 73±1°C до погружения препарата. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74°C. Увеличьте время погружения препарата в раствор для денатурации на 2-4 минуты.
	Препарат образца не достаточно подготовлен для FISH.	Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для протоколов, описывающих способ приготовления образца для FISH.
	Препараты образца неправильно выдержаны после использования.	Выдержите 24 часа при комнатной температуре до проведения FISH.
	Препараты образца не достаточно сухие перед погружением в раствор для денатурации.	Разогрейте образец до 45-50°C перед денатурацией или дегидрируйте препараты через серии моек в EtOH (70%, 85%, 100%).
	Образец был недостаточно смешан	Использование трипсин – Гимзе полосных образцов для FISH может потребовать регулирования полосности или протоколов гибридизации. Для дальнейшей информации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		по полосности перед FISH, свяжитесь с технической службой Abbott Molecular. Или приготовьте свежие препараты.
	Проба не добавлена	Приготовьте новую пробную смесь. Дайте пробе отмокнуть. Перемешайте реагенты, центрифугируйте. Медленно отмерьте пипеткой.
	Проба, буфер для гибридизации, и пробная смесь не были хорошо смешаны перед использованием.	Перемешайте или отмерьте пипеткой реагенты перед смешиванием, центрифугируйте.
	Пробы неправильно разведены для гибридизации.	Используйте объемы, заявленные в методике для поддержания соотношения пробной смеси (7 нл буфера для гибридизации: 1 нл пробы: 2 нл очищенной H2O). Убедитесь, что пипетка калибрована. Оставьте буфер для гибридизации на некоторое время и дайте ему достигнуть комнатной температуры перед использованием, медленно отмерьте пипеткой.
	Проба неправильно денатурирована. ПРИМЕЧАНИЕ: Не относится к пробам, поставляемым в буфере для гибридизации или денатурированном виде.	Убедитесь, что температура водяной бани использованной для денатурации пробной смеси составляет 73±1°C Денатурируйте пробную смесь в течение 5 минут.
	Проба не использована в отношении целевого образца сразу же после денатурации.	Спланируйте так, что пробы немедленно будет использована после того, как препараты извлечены из раствора 100% EtOH solution. Убедитесь, что EtOH испарился. Удалите пробирку, содержащую пробную смесь из 73±1°C водяной бани и немедленно поместите пробирку на нагреватель препаратов при температуре 45-50°C. Держите пробирку на нагревателе препаратов во время того, как отмериваете пипеткой пробу на препарат. Обработайте максимальное количество препаратов и поддерживайте правильные температуры и время обработки согласно методике.
Слабый сигнал или его отсутствие	Пробная смесь слишком сухая на препарате образца.	Немедленно поместите покровное стекло на целевую область после обработки пробной смеси. При помывке, удалите покровное стекло с 1 препарата и немедленно погрузите препарат в отмывочный раствор до удаления покровного стекла со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло путем касания поверхности пробной смеси. Поместите препарат с покровным стеклом в блоттер и мягко выдавите пузырьки воздуха.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что заявленное время и температура гибридизации были соблюдены. Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C. Закрепите покровное стекло резиновым цементом, не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Условия помывки или отмывочные растворы приготовлены неправильно.	Убедитесь, что отмывочные растворы были созданы согласно инструкции. Убедитесь, что температуры отмывочных растворов для методики соблюдены. Убедитесь, что термометры и pH метры откалиброваны правильно. Удалите покровные стекла до погружения препаратов в отмывочный раствор.
	Пробы или препараты образцов неправильно хранятся.	Храните неразведенную пробу при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Храните негибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в течение продолжительного времени или при комнатной температуре в течение короткого периода времени. Храните гибридизированные препараты при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте с течение 3 недель.
	Использован неправильный краситель. Краситель слишком яркий.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты путем погружений в EtOH длительностью в 1 минуту (70%, 85%,100%). Высушите препараты на воздухе и снова обработайте красителем.
	Видимая гибридизация с использованием несоответствующего набора фильтров.	Наборы мультиполосных фильтров обеспечивают меньше света, чем одиночные наборы фильтров, поэтому пробные сигналы могут побледнеть при просмотре с помощью мультиполосных наборов фильтров. Используйте правильный фильтр для просмотра флуорофоров пробы. Свяжитесь с Технической службой Abbott Molecular для получения дальнейшей информации.
	Не соответствующая результатам FISH конфигурация микроскопа, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Пробы разведены не соответствующим образом, часто слишком много пробы для количественного определения.	Убедитесь, что пробная смесь была сделана согласно инструкции.
	Несоответствующие условия гибридизации.	Убедитесь, что температура инкубатора составляет 37°C.
	Температура помывки слишком низкая.	Убедитесь, что буфер для гибридизации был добавлен к пробной смеси в соответствующем количестве. Поддерживайте температуру отмывочных растворов путем помещения 4 сосудов в сосуд Коплина и убедитесь, что температура отмывочного раствора правильная до мойки препаратов.
	Точность приготовления отмывочного раствора очень низкая.	Убедитесь, что отмывочные растворы были сделаны согласно инструкции. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем точнее приготовление.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Яркое или слабое окрашивание	Слабое окрашивание: препараты не достаточно дегидрированы до окрашивания или в красителе присутствуют капли масла. Неправильная концентрация красителя. ПРИМЕЧАНИЕ: краситель DAPI I в 8 раз более концентрированный, чем DAPI II. Краситель слишком старый или хранился на свету в течение продолжительного периода времени.	Удалите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре; дегидрируйте препараты серией 1-минутных моек в EtOH (70%, 85%,100%). Высушите на воздухе и снова добавьте краситель. Если окрашивание слишком яркое, разведите краситель в растворе (Список номер. 06J29-010) до использования. Храните краситель при температуре -20°C или ниже в защищенном от света месте. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Human Molecular Genetics* 2000;9(4):489-501.
2. Park IS, Ko JK, Kim YH, et al. Cardiovascular anomalies in patients with chromosome 22q11.2 deletion: A Korean multicenter study.
International Journal of Cardiology 2007; 114:230–235.
3. Yakut t, Sebnem Kilic S, Cil E, et al. FISH investigation of 22q11.2 deletion in patients with immunodeficiency and/or cardiac abnormalities. *Pediatr Surg Int* 2006;22:380–383.
4. Manji S, Roberson JR, Wiktor A, et al. Prenatal diagnosis of 22q11.2 deletion when ultrasound examination reveals a heart defect. *Genetics IN Medicine* 2001;3(1):65-66.
5. Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC , et al. Microduplication 22q11.2, an Emerging Syndrome: Clinical, Cytogenetic, and Molecular Analysis of Thirteen Patients. *Am J Hum Genet* 2003;73:1027–1040.
6. Portnoi ME, Lebas F, Gruchy N, et al. 22q11.2 duplication syndrome: two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet A* 2005;137(1):47-51.
7. National Center for Biotechnology Information (NCBI Build) 36.1, March 2006.
8. 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.
9. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
10. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
12. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Использование зонда Vysis LSI TUPLE (HIRA) SpectrumOrange/LSI ARSA SpectrumGreen Probe Set осуществляется на основании европейского патента № 5,663,319 и 5, 491,224, приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента № RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696 и 6, 607, 877 приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CEP, HyBrite, LSI, SpectrumGreen, SpectrumAqua, SpectrumOrange, SpectrumRed, Vysis и WCP являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

ThermoBrite является торговой маркой группы компаний Сэмпл Процессинг, Инк.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2006, 2020 Abbott. Все права защищены.

www.abbottmolecular.com

Июль 2020
30-608221/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 Dual Color Probe Set

en

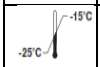
REF 08L68-020

30-608224/R4

Vysis LSI EGR1/D5S23,
D5S721 Dual Color Probe Set
REF 08L68-020
30-608224/R4

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения делеции пробной цели LSI EGR 1 сегмента хромосомы 5q31.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

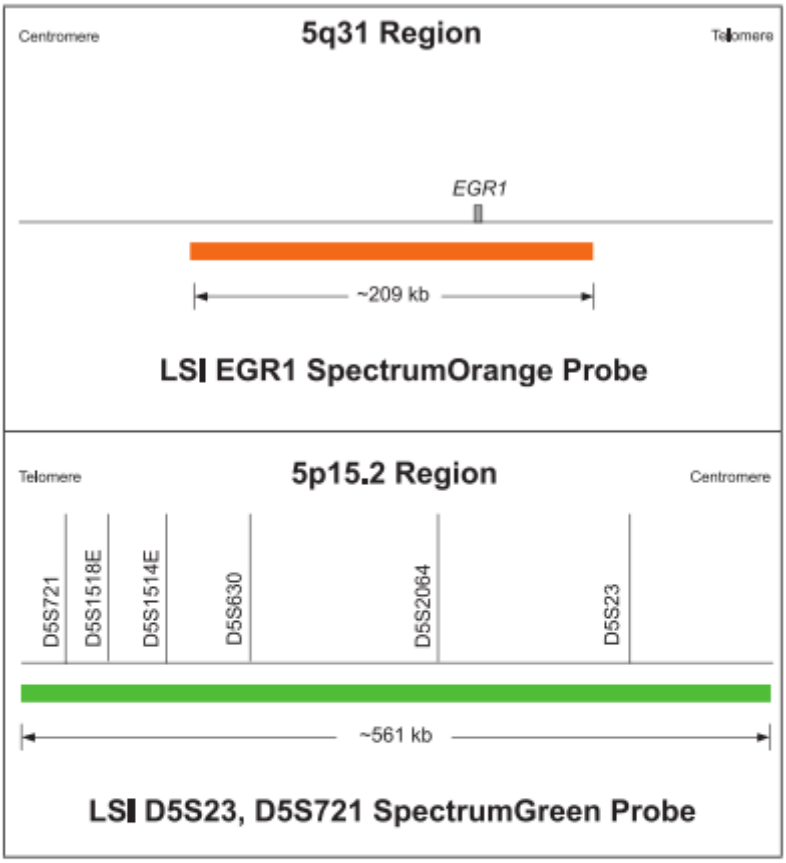
Делеция хромосомы 5q или полная потеря 5 хромосомы, являются распространенными аномалиями при миелодиспластическом синдроме (МДС) и остром миелолейкозе (ОМЛ). Делецированный сегмент хромосомы 5q31 был идентифицирован, и 1 ген раннего ответа роста EGR1 является одним из генов-кандидатов в данном сегменте.[1] Результаты недавнего исследования говорят о том, что нарушения гаплоидности гена EGR1 может играть роль в развитии лейкоза.[2]

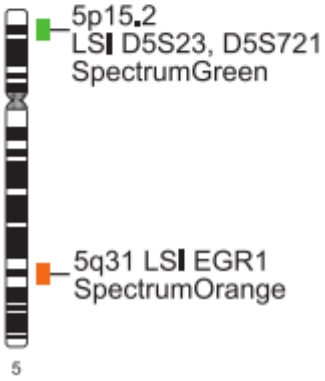
Набор двухцветных проб LSI EGR1/D5S23, D5S721 был использован в нескольких исследованиях для определения делеций EGR1. Zoe и коллеги[3] использовал данный набор проб на 145 пациентов с миелоидными заболеваниям и сравнил результаты с привычными цитогенетическими исследованиями. Vance и коллеги[4] использовал данный набор проб в клиническом исследовании Восточной Кооперативной Онкологической Группы для определения пользы интерфазной FISH для стратификации пациентов по категориям цитогенетического риска ОМЛ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Набор двухцветных проб LSI EGR1/D5S23, D5S721 является смесью пробы SpectrumOrange EGR1 (5q31) и Spectrum Green D5S23,D5S721 (5p15). Длина пробы LSI EGR1 примерно 209 kB в длину. LSI D5S23,D5S721 охватывает примерно 561 Kb.



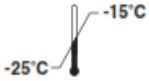


РЕАГЕНТЫ

1. Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 набор двухцветных проб (Серийный номер 30-191021) (1 пробирка, 20 мкл/пробирку). 400 нг/мкл. Флуорофор-маркированная проба ДНК и блокирующий ДНК в трис-ЭДТА буфер.

2. Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации (Серийный номер 30-804826) (1 пробирка, 150 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Условия хранения



Vysis EGR1/D5S23, D5S721 набор двухцветных проб, должен храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия транспортировки
Во время транспортировки Vysis EGR1/D5S23, D5S721 набор двухцветных проб транспортируется на сухом льду.
Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в службу технической поддержки компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**
Vysis EGR1/D5S23, D5S721 набор двухцветных проб

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[6]

• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения:

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Подготовка реагентов
ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0–8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2–8°C. Срок хранения – 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)
Из 100% этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3% NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).
Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2 – 3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Методика
Требуемые материалы
- Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 набор двухцветных проб
- Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации

Необходимые материалы (не в комплекте)

- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Пипеттор (1 -10 мкл)
● pH-метр
● Чистые стеклянные предметные стекла
● Дистиллированная вода
● Таймер
● Вихревая мешалка
● Водяная баня (37°C и 72°C)
● Флуоресцентный микроскоп
● Термостат (37°C)
● 20X SSC
● NP-40
● Формамид ультравысокой очистки
● Контрастирующий краситель DAPI II
● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100% этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70% раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.

1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.

3. Обработайте микропрепараты 70% раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100% этанолом (1 мин.).

ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100% этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.

ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Извлеките микропрепараты из 100% этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания
ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3% NP-40.
Приготовление промывочных растворов:
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4XSSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.
Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C, проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводится с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других данных клинико-диагностических исследований.[5] Отдельные лаборатории должны установить аналитический нормальный порог для интересующего сигнала паттернов.

Ожидаемые результаты

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В нормальном ядре, гибридизированном с помощью набора двухцветных проб LSI EGR1/D5S23,D5S721 ожидаемым результатом являются 2 оранжевых и 2 зеленых (202G) сигналов. В ядре с делецией целевого EGR1 в одном гомологе 5 хромосомы, наблюдается рисунок 1 оранжевого (EGR 1), и 2 зеленых (D5S23,D5S721), сигналов. При более комплексных аномалиях могут наблюдаться другие рисунки сигналов. Интерпретация результатов FISH должна быть произведена путем утилизации соответствующих контролей и аналитических техник [5] наряду с учетом других клинических и диагностических данных тестирования.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70-73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).
2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºС и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºС (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºС в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

выше концентрации красителя DAPI II.	
Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Lai F, Godley LA, Joslin J, et al. Transcript Map and Comparative Analysis of the 1.5 Mb Commonly Deleted Segment of Human 5q31 in Malignant Myeloid Diseases with a del(5q). *Genomics* 2001;71:235-45.
2. Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, et al. Haploinsufficiency of EGR1, A Candidate Gene in the del(5q), leads to the Development of Myeloid Disorders. *Blood* 2007;110(2):719-726.
3. Zou YS, Fink SR, Stockero KJ, et al. Efficacy of Conventional Cytogenetics and FISH for EGR1 to Detect Deletion 5q in Hematological Disorders and to Assess Response to Treatment with Lenalidomide. *Leuk Res* 2007;31:1185-89.
4. Vance GH, Kim H, Hicks GA, et al. Utility of Interphase FISH to Stratify Patients into Cytogenetic Risk Categories at Diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Clinical Trial (E1900). *Leuk Res* 2007;31:605-09.
5. 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
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

Использование зонда Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 FISH Ptobe Kit осуществляется на основании европейского патента № 5,663,319 и 5, 491,224, приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента № RE40, 494, 6, 596, 479, 7, 115, 709, 5, 756, 696 и 6, 607, 877 приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold, HyBrite, CEP, LSI, WCP и Vysis являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

ThermoBrite является торговой маркой группы компаний Сэмпл Процессинг, Инк.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

˚2007, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608224/R4

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis MultiVysion PB Multi-color FISH Probe Kit

en

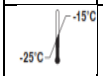
REF 08L62-020

30-608468/R5

Vysis MultiVysion PB
Multi-color FISH Probe Kit
REF 08L62-020
30-608468/R5

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Международная Служба поддержки клиентов
Позвоните представителю Abbott в своей стране
Перед использованием внимательно прочтите листок-вкладыш. Следует соблюдать рекомендации, указанные в инструкции внутри упаковки. Достоверность результатов не может быть гарантирована если были произведены какие-либо отклонения от рекомендаций, указанных в инструкции внутри упаковки.

Название
Vysis MultyVysion PB Multi-color FISH Probe Kit

Назначение
Данная проба флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) предназначена для определения число копий хромосом 13, 16, 18, 21, и 22.

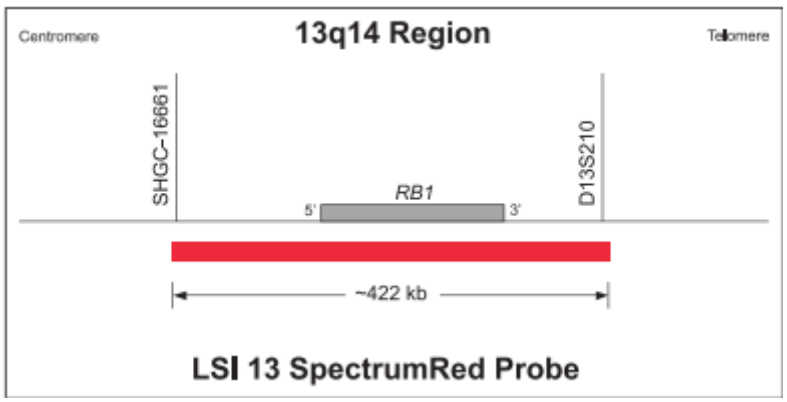
Назначение и разъяснение теста
Преимплантационный генетический диагноз скрининга на анеуплоидию (PGD-AS) с использованием многоцветных маркированных проб FISH стал мощным диагностическим инструментом для анализа плоидного статуса нескольких хромосом одновременно. Клинические исследования говорят о том,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

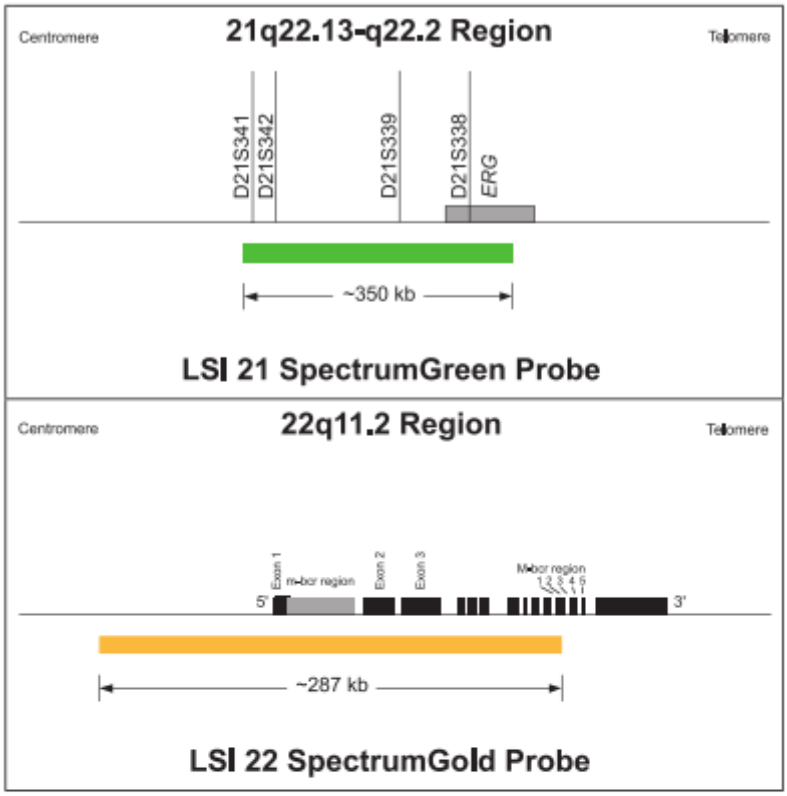
что PGD-AS повышает процент имплантации и ограничивает спонтанные прерывания беременности у женщин с плохим исходом после ЭКО (возраст матери ≥ 35 лет (AMA), многократная неудача ЭКО (RIF), привычный выкидыш (RSA)). [1-3]
PGD-AS может содержаться на полоцитах и бластоцистах. Нанесение на полоцисты менее инвазивно, но связано с отсутствием определения наследственных заболеваний и нарушений раннего эмбрионального развития.
Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PB FISH содержит комплементарные пробы ДНК FISH разработанные для анализа количества копий хромосом в полоцитах. Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PB FISH определяет следующие хромосомные анеуплоидии: 13 хромосомы (синдром Патау), 18 (синдром Эдварда), 21 (Синдром Дауна), и трисомии 16 и 22.
Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PB FISH был использован в исследованиях.[3-5] В большом рандомизированном контролируемом исследовании Kahraman и коллеги провели скрининг 276 пар, использовавших ЭКО, включая группы AMA, RIF, RSA, и AGCM (аномальная морфология гаметы) с использованием MultiVysion PB. Исследование дало повод думать, что AGCM является одним из основных показаний к PGD, т.к. в данной группе наблюдались высокий уровень анеуплоидий. Более того, исследование установило, что PGD-AS с использованием MultiVysion PB является полезным инструментом, повышающим успех ЭКО у пар с плохим прогнозом, которые пользуются вспомогательными репродуктивными методиками.[4]

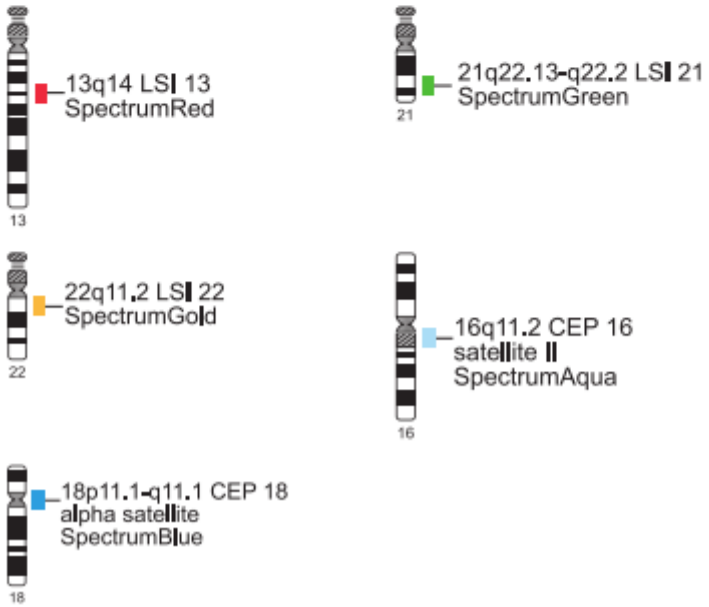
Описание пробы
Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PB FISH содержит смесь проб 5-ти цветов последовательностей ДНК, гомологичных специфическим областям хромосом 13, 16, 18, 21, и 22. Каждая из проб напрямую маркирована одним из флуорофоров Vysis. Смесь проб состоит из:
LSI 13: Проба ДНК, охватывающая ген RB1 (13q14) маркированный SpectrumRed
CEP 16: D16Z3 сателлитная проба ДНК II (16q11.2) маркированная SpectrumAqua
CEP 18: D18Z1 сателлитная проба ДНК (18p11.1-q11.1) маркированная SpectrumBlue
LSI 21: ДНК проба локусов D21S341, D21S342, D21S339, EGR, и D21S338 (21q22.13-21q22.2) маркированных SpectrumGreen
LSI 22: ДНК проба локуса BCR (22q11.2) маркированная SpectrumGold.
Маркированная флуорофором человеческая плацентарная ДНК (SpectrumAqua) также включена в пробную смесь для обеспечения окрашивания ядер, которые не взаимодействуют с флуоресцентным сигналом пробы. Немаркированная блокированная ДНК также включена в пробу для подавления последствий распространения целевых локусов на другие хромосомы.

Проба LSI 13 размером приблизительно 422 Kb (Геномный браузер chr:13:476333474-48055347, Февраль 2009, Человеческий Геномный браузер)[12]. LSI 21 проба размером приблизительно 350 Kb (Геномный браузер chr:39491467-39841748, Февраль 2009, Человеческий Геномный браузер)[12]. Проба LSI 21 размером приблизительно 287 Kb (chr22:2334511-23632068; Февраль 2009, Человеческий Геномный браузер)[12].



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

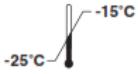




РЕАГЕНТЫ

1. Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PB FISH (Номер партии: № 30-111085) 60 мкл (20 исследований). Флуорофор-маркированные пробы ДНК хромосом 13, 16, 18, 21, и 22 в буфере для гибридизации, содержащем декстрана сульфат, формамид и SSC.

ХРАНЕНИЕ



Набор многоцветных проб Vysis MultiVysion PB FISH должен храниться при температуре -20°C (±5°C) и ниже, в защищенном от света месте.

Дата истечения срока годности указана на внешней упаковке и пробирке.
Разрушение: флуорофоры быстро обесцвечиваются на свету. Чтобы не допустить этого, обращайтесь со всеми растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, при слабом освещении. Проводите все этапы работы, для которых не требуется освещение (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Условия транспортировки
Многоцветная проба Vysis MultiVysion PGT FISH транспортируется в сухом льду.
Если вы получили реагенты в состоянии, отличном от указанного на маркировке, или в поврежденном виде, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**
Использовать только для in vitro диагностики.
Vysis MultiVysion PB Multi-color Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы, не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[8], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[9], CLSI документ M29-A3[10], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[11].
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[8]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[11].

Vysis MultiVysion PB Multi-color Probes

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление реагентов
Приготовление рабочих растворов реагентов для подготовки полоцитов и бластоцитов
Гипотонический раствор (0.6% БТА, 1% цитрат натрия) [для подготовки бластоцитов]:
Добавьте:
0.3 г альбумина бычьей сыворотки (БТА)
0.5 г цитрата натрия
50 мл очищенной воды
Хорошо перемешайте. Профильтруйте через 0.2 мкм фильтр. Хранить при 2 - 8°C. Использовать в пределах 1 месяца.

Фиксатор Карноя:
Смешайте:
25 мл уксусной кислоты
75 мл метанола
Вылейте в стеклянный сосуд с крышкой. Переверните сосуд несколько раз. Хранить при температуре -20°C. Использовать в течение 2 часов. Утилизировать после использования.

Метанол: Налейте примерно 70 мл чистого метанола в стеклянный сосуд Коплина. Немедленно используйте. Закройте крышкой вне использования.

Приготовление рабочих растворов реагентов для исследования MultiVysion
20X SSC (pH 5.3):
Смешайте:
66 г 20X SSC
200 мл очищенной воды
250 мл общий объем
Тщательно перемешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите до pH 5.3 концентрированной HCl, если необходимо. Доведите общий объем до 250 мл. Профильтруйте через 0.45 мкм фильтр. Хранить в закрытом контейнере при комнатной температуре до 6 месяцев.

0.3% NP-40 в 0.7X SSC (Раствор для мойки после гибридизации):
Смешайте:
962 мл* очищенной воды
35 мл 20X SSC pH 5.3
3 мл NP-40
1000 мл общий объем
Доведите объем до 1000 мл очищенной водой. Тщательно перемешайте. Доведите pH до 7.0 - 7.5 1N NaOH, при необходимости, используя pH метр со стеклянным pH электродом. Профильтруйте через 0,45 мкм фильтр. Хранить неиспользованный раствор в закрытом контейнере при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Утилизировать в конце дня.
*или доведите объем до 1000 мл очищенной водой

0.1% NP-40 в 2X SSC (Раствор для мойки после гибридизации):
Смешайте:
100 мл 20XSSC pH 5.3
899 мл* очищенной воды
1 мл NP-40
1000 мл общий объем
Доведите объем до 1000 мл очищенной водой. Тщательно перемешайте. Доведите pH до 7.0 - 7.5 1N NaOH, при необходимости, используя pH метр со стеклянным pH электродом. Профильтруйте через 0,45 мкм фильтр. Добавьте 70 мл в сосуд Коплина и поддерживайте комнатную температуру. Хранить неиспользованный раствор в закрытом контейнере при комнатной температуре до 6 месяцев. Утилизировать раствор, который был использован при количественном определении в конце каждого дня. *или доведите объем до 1000 мл очищенной водой

Подготовка человеческих полоцитов для флуоресцентной гибридизации In Situ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Данная методика используется после удаления полоцитов. Полоциты выделяются из неоплодотворенных яйцеклеток путем механической дессекции.[6,7]

Методика

1. Подготовьте фиксатор (метанол: ледяная уксусная кислота, 3:1) и храните в морозильной камере до использования.
2. Подготовьте сосуд Коплина с метанолом.
3. Вырежьте небольшой круг на дне чашки петри 35 х 10 мм. Круг идентифицирует целевую область для помещения полоцитов.
4. Запишите идентификацию образца и информацию на замороженной области микроскопического препарата. Очистите препарат с помощью фиксатора Карноя и нетканого материала.
5. Создайте на предметном стекле висячую каплю очищенной воды.
6. Подогрейте наконечник 25 мкл капиллярной пипетки с использованием микрогорелки и одновременно вытяните нагретый наконечник пипетки, чтобы его внутренний диаметр составлял 50 мкм. Убедитесь, что вытянутый наконечник пипетки ровный и не является острым. Острый наконечник может повредить полоцит. Снова подправьте наконечник, если это необходимо, чтобы он не был острым. Размер отверстия пипетки должен быть проверен до взятия полоцита для того, чтобы убедиться в его правильном размере, если диаметр слишком большой, существует большая вероятность утраты полоцита.
7. Наберите небольшое количество (2-3 мкл) воды в пипетку.
8. Используя стереомикроскоп, локализуйте полоцит на чашке петри.
9. Мягко аспирируйте полоцит в пипетку и перенесите в висячую каплю воды на предметном стекле. Легким нажатием высвободите полоцит из пипетки, помещая его в центр круга висячей капли на предметном стекле.
10. Пипеткой аспирируйте полоцит из воды с малым количеством воды. Переместите клетку на предметное стекло с малым количеством воды. Маркером из твердого сплава нанесите круг на стекле вокруг капли воды.
11. Дайте полоциту сохнуть в капле воды на стекле, контролируя его с помощью инвертируемого микроскопа. При высыхании, аспирируйте небольшое количество фиксатора (около 2-3 мкл) в ту же пипетку и капните фиксатор на полоцит.

Примечание: При фиксации первых полоцитов через 6 часов после выделения, добавьте фиксатор только перед полным высыханием, чтобы удалить всю цитоплазму.

12. Поместите другую каплю фиксатора из пипетки на клетку до полного высыхания кроме случаев, когда растворение цитоплазмы очевидно произошло. Повторите до полного растворения цитоплазмы, убедитесь, что осталось лишь ядро (наносите фиксатор по крайней мере 5 раз).

Примечание: Полное удаление цитоплазмы обязательно для оптимальной гибридизации.

13. Нарисуйте чертилкой два круга вокруг хроматина на предметном стекле. Один круг больше чем другой, т.е. один круг находится внутри другого с клеткой в середине малого круга. Круг вокруг клетки позволяет проще локализовать клетку после гибридизации.
14. Поместите предметное стекло в сосуд Коплина с метанолом на 5 минут.
15. Выньте препарат из метанола и дайте высохнуть.
16. Используя шкалу нониуса микроскопа или предметного стекла с разметкой областей (стекла England Finder), локализуйте и зарегистрируйте локализацию клетки на микропрепарате. Эти координаты помогут локализовать клетку после гибридизации.
17. Нарисуйте чертилкой другой маленький круг на дне микропрепарата вокруг клетки, используя тот же маркер. Это определит область нанесения 3 мкл пробного раствора.
18. Если исследование MultiVysion не будет произведено сразу, поместите препарат в контейнер для препаратов с крышкой и храните при температуре -20°C до использования.

Приготовление человеческих бластоцитов для флуоресцентной гибридизации In Situ

Данная процедура производится после биопсии бластомера. Отдельные бластомеры биопсируются путем механической диссекции.[7]

Методика

Поместите бластоцит в микрокаплю культурной среды в чашку петри диаметром 35 мм.

1. Подготовьте гипотонический раствор.
2. Подготовьте сосуд Коплина с метанолом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Обведите небольшой круг на дне чашки петри 35 x 10 мм и добавьте 3 мл гипотонического раствора. Круг идентифицирует целевую область для помещения бластомеров, что облегчает релокализацию.
4. Запишите идентификационные признаки образца и соответствующую информацию на предметном стекле замороженного микропрепарата. Предварительно вытрите стекло , используя фиксатор Карноя и нетканый материал.
5. Подогрейте наконечник 25 мкл капиллярной пипетки с использованием микрогорелки и одновременно вытяните нагретый наконечник пипетки так, чтобы его внутренний диаметр составлял 60-100 мкм. Убедитесь, что вытянутый наконечник пипетки имеет равные края и не является острым. Острый наконечник может повредить бластомер. Снова подправьте наконечник, если это необходимо, чтобы он не был острым. Необходимо убедиться в том, что размер отверстия наконечника пипетки больше размера бластомера.
6. Втяните небольшое количество (примерно 2-3 мкл) гипотонического раствора пипеткой.
7. Используя стереомикроскоп, поместите бластомер в чашку петри.
8. Осторожно втяните бластомер пипеткой и перенесите его в чашку петри с каплей гипотонического раствора, размещая его в центре очерченного круга.
9. Оставьте бластомер в гипотоническом растворе на 5 минут. Переместите бластомер из гипотонического раствора путем аспирации его пипеткой с малым количеством гипотонического раствора. Соблюдайте осторожность, чтобы не втянуть бластомер слишком далеко вглубь пипетки. Переместите клетку на предметное стекло с малым количеством гипотонического раствора.
10. Поместите микропрепарат в инвертационный микроскоп. Дайте бластомеру сохнуть в капле раствора на препарате, контролируя процесс через инвертационный микроскоп. Внимательно следите за бластомером, пока процесс высыхания почти не закончится. Перед завершением высыхания, втяните той же пипеткой небольшое количество фиксатора (примерно 2-3 мкл) и капните фиксатор на бластомер.
11. Непрерывно наблюдайте за клеткой через инвертационный микроскоп, с момента начала высыхания фиксатора.
Перед завершением высыхания поместите еще одну каплю фиксатора из пипетки на клетку. Повторите шаг 11 несколько раз, пока не будет очевидно, что произошло растворение цитоплазмы и осталось только ядро.
Примечание: Перед нанесением следующей капли не дожидайтесь полного высыхания фиксатора. Полное удаление цитоплазмы обязательно для оптимальной гибридизации пробы.
12. С помощью чертилки нарисуйте два круга вокруг ядра клетки на поверхности предметного стекла. Один круг должен быть немного больше, чем другой, т.е., один круг находится внутри другого с клеткой в середине малого круга. Круг вокруг клетки позволяет проще локализовать клетку после процесса гибридизации.
13. Поместите предметное стекло в сосуд Коплина с метанолом и оставьте его там до начала процедуру гибридизации.
14. Непосредственно перед проведением гибридизации или в случае помещения предметного стекла на хранение, если гибридизация не будет проводиться в этот день, выньте предметное стекло из раствора метанола и дайте ему высохнуть.
15. С помощью шкалы нониуса микроскопа или предметного стекла с разметкой областей (стекла England Finder) разместите и зафиксируйте местоположение клетки на предметном стекле.
16. Очертите чертилкой из твердого сплава на другой стороне предметного стекла другой больший круг вокруг клетки. Определите область, куда необходимо нанести 3 мкл раствора пробы, очертив круг той же чертилкой с обратной (нижней) стороны предметного стекла.
17. В случае, если исследование MultiVysion не будет проводиться сразу же, поместите предметное стекло в контейнер с крышкой для хранения предметных стекол и храните при температуре - 20˚ C до следующего использования.

Использование контрольных препаратов

Контрольные препараты должны использоваться конкурентно с образцами препаратов для мониторинга исследования. Рекомендуется использовать контрольные препараты каждый день тестирования FISH. Контрольные препараты Vysis Probe Check MultiVysion являются рекомендованными (кат.номер **05J07-001**).

Методика флуоресцентной гибридизации MultiVysion *in situ*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Настройка параметров HYBrite
См. Руководство пользователя HYBrite для получения информации об использовании инструмента.

Методика
Требуемые материалы
- Многоцветные пробы Vysis MultiVysion PB

Требуемые, но не предоставляемые материалы
- 12N HCl (для регулировки pH отмывочных растворов)
- 1N NaOH (для регулировки pH отмывочных растворов)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипеток объемом 1 - 10 мкл
- Микродозатор объемом 1 - 10 мкл
- pH метр
- Предварительно очищенные предметные стекла
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (вортекс)
- Водяная баня (73°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Parafilm
- Antifade II
- Метанол
- Кристаллическая уксусная кислота(Glacial acetic acid)
- Цитрат натрия (Sodium citrate)
- Альбумин бычьей сыворотки (Bovine serum albumin)
- 20X SSC
- NP-40
- Столик с подогревом

Установка параметров HYBrite
См. Руководство пользователя HYBrite для большей информации по использованию данного инструмента.
1. Увлажните водой две полоски бумажного полотенца и поместите полотенца на углубления нагревательной поверхности HYBrite.
Не допускайте попадания воды напрямую в углубление.
2. Включите HYBrite. Установите программу
Melt Temp на температуру плавления 69°C и на время плавления на 8 минут. Установите
Hyb Temp на температуру гибридизации 37°C и время гибридизации на 4 часа. Дайте HYBrite разогреться до 37°C.

Гибридизация
3. Возьмите пробу MultiVysion PB из места хранения при температуре -20°C и дайте нагреться до комнатной температуры. Если образцы препаратов были на хранении при температуре -20°C, возьмите их оттуда и дайте им нагреться до комнатной температуры.
4. Поместите препараты образцов на поверхность HYBrite. Заполните пустые ячейки пустыми предметными стеклами.
5. Нанесите 3 мкл раствора пробы MultiVysion на область препарата, в которой находится клетка.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Накройте 12 мм покровным стеклом целевую область сразу же после нанесения раствора пробы. (Осторожно поместите покровное стекло на пробный раствор, сначала один край, чтобы избежать образования пузырьков).
7. Вырежьте кусочек пленки Parafilm размером с предметное стекло и поместите его на препарат, накройте покровным стеклом. Parafilm предупреждает высыхание раствора пробы во время гибридизации.
8. Закройте крышку HYBrite и начните программу гибридизации/плавления. Программа начнется с фазы плавления, а завершится 4-х часовой гибридизацией.
Примечание: Максимально рекомендованное время гибридизации составляет 8 часов; тем не менее, 4 часа является оптимальной длительностью. Более долгая гибридизация может привести к избыточному окрашиванию ядер, которое может привести к ослаблению сигналов пробы.

Промывка препаратов
9. Во время гибридизации, наполните сосуд Коплина 0.7X SSC/0.3% NP-40 pH 7.4 и поместите в водяную баню 73°C. Используя калиброванный термометр, проверьте температуру раствора снаружи сосуда до добавления препаратов для промывки. Температура раствора должна составлять 73 ± 1°C.
10. Наполните второй сосуд 2X SSC/ 0.1% NP-40, pH 7.4 и оставьте при комнатной температуре.
11. По завершении программы HYBrite, удалите препараты из HYBrite. Удалите парафильм и накройте препараты покровными стеклами.
12. Поместите препараты в 0.7X SSC/ 0.3% NP-40 сразу же после удаления покровного стекла. Когда все препараты помещены в сосуд (максимум 4), выдерживайте 7 минут. Примечание: Не осуществляйте мойку более 4 препаратов одновременно в одном и том же сосуде. Помещение отдельного препарата в сосуд не должно занимать более, чем несколько секунд; если это так, убедитесь, что препарат не будет находиться в промывочном буфере более 7 минут. После удаления препаратов, дайте температуре дойти до 73 ± 1°C перед промывкой следующих препаратов.
13. После 7 минут, удалите препараты из промывочного раствора и поместите препараты в сосуд Коплина, содержащий 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре. Выдержите 1 минуту.
14. Удалите препараты из отмывочного раствора и поместите вертикально в темную область на бумажное полотенце для полного высыхания.
15. Добавьте 3 мкл Antifade II в целевую область и накройте 12 мм круглым покровным стеклом раствор Antifade II, избегая образования пузырьков воздуха. Не добавляйте краситель DAPI, так как он заблокирует сигнал SpectrumBlue маркированной пробы. Клетки или хромосомы могут быть локализованы с использованием набора однополосных фильтров Aqua, т.к. SpectrumAqua флуорофор-маркированная ДНК, содержащаяся в пробной смеси, позволяет идентифицировать клетки и определить их границы.
Примечание: Если желательным является другой тип окрашивания для идентификации клеток и их локализации, рекомендуется окрашивание разведенным пропидиум иодида. КрасительVysis пропидиум иодид (Список номер. 07J06-001) должен быть разведен (объем :объем)1 к 6 с Vysis Antifade II (кат. номер. 06J29-001). Хорошо перемешайте и нанесите на целевую область. Используйте набор оранжевых однополосных фильтров для локализации клетки.
16. Рассмотрите препараты с помощью флуоресцентного микроскопа и соответствующего набора фильтров (см.ниже).
17. Гибридизированные образцы могут храниться до 1 месяца при температуре -20°C без значительного разрушения флуоресцентных сигналов пробы.

Визуализация результатов
Соответствующие визуализация и анализ MultiVysion PB результатов гибридизации зависит от использования оптимального набора фильтров и хорошо настроенного флуоресцентного микроскопа. Некоторые наборы фильтров, необходимые для визуализации и анализа результатов MultiVysion PB могут отсутствовать в Вашей лаборатории. Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для получения большей информации по спецификации наборов фильтров.
Все наборы фильтров являются доступными через компанию Abbott Molecular, Inc.
Следующие минимальные наборы фильтров рекомендованы для визуализации результатов MultiVysion PB.
1. Голубой/аква двухполосный набор

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Зеленый/красный двухполосный набор
3. Желтый однополосный набор
4. Аква однополосный набор (опциональный для уточнения сигналов, наблюдаемых при голубом/аква двухполосном наборе при слабой остроте визуализации отличия голубого и аква или в случае, если интенсивность сигнала аква меньше оптимального)

Имеются также наборы однополосных фильтров для каждого из пяти флуоресцентных проб (SpectrumBlue, SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumGold и SpectrumRed) для максимального объяснения каждого из отдельных сигналов FISH. Однополосные фильтры дают самую большую интенсивность флуоресценции и самый слабый фоновый свет, в результате этого дают самые отчетливые флуоресцентные сигналы. К тому же, перекрывающиеся сигналы, образованные в результате позиционирования целевой ДНК в пределах ядра клетки, лучше всего различимы с использованием наборов однополосных фильтров. Данный метод анализа обеспечивает наиболее простой и самый точный сигнал для дальнейшей интерпретации. Изображения пробы также могут быть получены с помощью пяти отдельных однополосных фильтров.

Примечание: При использовании наборов однополосных фильтров для визуализации или изображения сигнал пробы SpectrumBlue должен быть визуализирован первым.

Данная последовательность рекомендуется с целью минимизировать продолжительность фотоотбеливания путем рассматривания наиболее чувствительных флуорофоров первыми. Если метод однополосных фильтров является предпочтительным, тогда они должны быть использованы следующим образом:

1. Голубой однополосный набор (для SpectrumBlue)
2. Аква однополосный набор (для SpectrumAqua)
3. Зеленый однополосный набор (для SpectrumGreen)
4. Желтый однополосный набор (для SpectrumGold)
5. Красный однополосный набор (для SpectrumRed)

Примечание: некоторое смешивание флуоресценции может наблюдаться при использовании однополосных наборов фильтров. Флуоресцентные сигналы SpectrumAqua пропускаются набором голубых однополосных фильтров и яркие флуоресцентные сигналы SpectrumBlue пропускаются набором аква однополосных фильтров.

Яркие флуоресцентные сигналы SpectrumGold могут немного пропускаться зеленым однополосным или зеленым/красным двухполосным наборами фильтров.

Проверьте результаты гибридизации следующим образом:

1. Обнаружьте целевую клетку методом фазово-контрастной микроскопии, при малом увеличении (100X), с использованием предварительно записанных координат.
2. После локализации клетки, без изменения кратности увеличения микроскопа переключитесь на флуоресцентный свет с использованием набора однополосных фильтров аква и релокализуйте клетку при малом увеличении (100X). После релокализации клетки методом флуоресценции, переключитесь на большое увеличение (1000X) для анализа.

Если набор двухполосных фильтров аква/голубой используется для анализа SpectrumAqua и SpectrumBlue маркированных проб, локализуйте и проведите анализ следующим образом**:**

Локализуйте клетку, используя набор однополосных фильтров аква.

Анализируйте каждую из проб с использованием следующей последовательности фильтров: 1) двухполосный аква/голубой, 2) двухполосные зеленый/красный, 3) желтый однополосный.

Примечание: рекомендуется, чтобы образец был визуализирован в данной последовательности для минимизации фотообесцвечивания. При соблюдении данной последовательности наиболее чувствительные флуорофоры экспонируются свету первыми.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Этот комлект не предназначен для оценки трисомии 21 хромосомы.
- Для оптимального выполнения данного исследования требуется соответствующий образец, подготовка и хранение как указано внутри упаковки.
- Vysis MultiVysion PB Multi-Color FISH Probe Kit предназначен для идентификации количественного определения хромосомных аббераций хромосом 13,16, 18, 21, 21 и 22.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Производительность Vysis MultiVysion PB Multi-Color FISH Probe Kit была установлена с использованием методик, изложенных в данном листке-вкладыше к этому набору. Изменения в этих методиках могут повлиять на выполнение анализа.
- Интерпретация любых результатов исследований должна оцениваться в контексте других результатов лабораторных исследований.
- Результаты FISH-исследований могут быть неинформативными, если качество образца или подготовка предметных стекол была проведена неадекватно.
- Исследователи, выполняющие подсчет FISH-сигналов должны быть способными визуально различать красный, зеленый, синий, голубой и желтые сигналы.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online*. 2003;7(1):91-7.
2. Munne S, Chen S, Fischer J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 2005;84(2):331-5.
3. Bloechle M, Marr S, Guillot P, et al. P-698: Polar body analysis of 314 unfertilized oocytes: what can we learn? *Fertil Steril.* 2006;86(3) Suppl. 2:S392-3.
4. Kahraman S, Benkhalifa M, Donmez E, et al. The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques. *Prenat Diagn*. 2004;24(4):307-11.
5. Baart EB, Martini E, and D. Van Opstal. Screening for aneuploidies of ten different chromosomes in two rounds of FISH: a short and reliable protocol. *Prenat Diagn*. 2004;24(12):955-61.
6. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, et al. Pregnancies following preconception diagnosis of common aneuploidies by
Fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1995;10(7):1923-1927.
7. Verlinsky Y and Kuliev A, eds. *Preimplantation Diagnosis of Genetic Diseases: A New Technique for Assisted Reproduction.* New York: Wiley Liss. 1994.
8. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. *Type*> www.cdc.gov, *search*>BMBL5>*look up* sections III and IV.].
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
11. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
12. Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz. The UCSC Genome Browser. © The Regents of the University of California. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=185806115&clade=mammal&org=Human&db=hg19. Accessed April 28, 2014.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

MultiVysion, ProbeChek, SpectrumRed, SpectrumBlue, SpectrumGold, SpecrtumAqua, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectraVysion, HYBrite CEP, LSI and Vysis, и являются торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

°2009, 2020 Abbott. Все права защищены
www.abbottmolecular.com
Июль 2020
30-608468/R5

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis D7S522/CEP 7 FISH Probe Kit

en

REF 05N08-020

30-608465/R3

Vysis D7S522/CEP 7
FISH Probe Kit
REF 05N08-020
30-608465/R3

Изменения выделены

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурные ограничения
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Зонд для флуоресцентной гибридизации Vysis D7S522/CEP7 (FISH) предназначен для выявления исследуемой последовательности зонда LSI D7S522 и CEF 7 на участке хромосомы 7q31 и 7p11.1-q11.1 соответственно.

Описание процедуры и пояснения

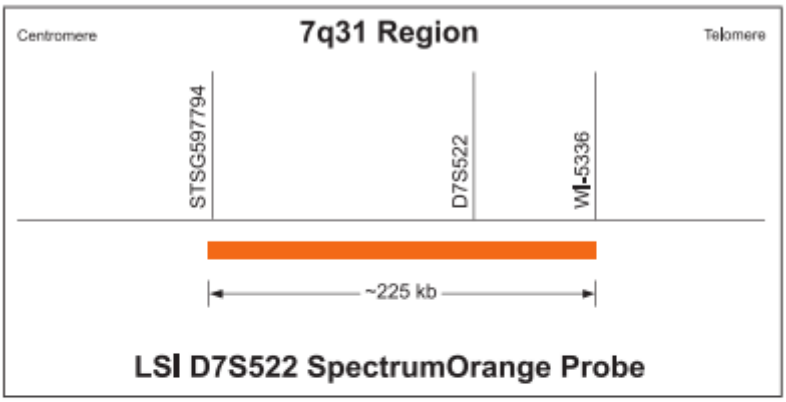
Моносомия по хромосоме 7 и отсутствие хромосомы 7q наблюдается при некоторых гемобластозах, таких как миелодиспластический синдом (MDS) и острый миелоидный лейкоз (AML). В некоторых случаях это может влиять на прогноз пациента.[1,2] Зонды Vysis LSI D7S522 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen используются для выявления аномалий LSI D7S522 и CEP 7 при остром миелоидном лейкозе и миелодиспластическом синдроме.[3,4]

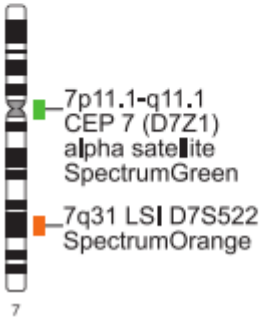
Описание зондов D7S522/CEP 7

Зонды Vysis LSI D7S522 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen - это смесь зонда D7S522 SpectrumOrange (7q31) и CEP 7 SpectrumGreen (7p11.1-q11.1). Размер зонда LSI D7S522 составляет

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

около 224 килобаз (хромосома 7:115705546-115929648; март 2006 UCSC Human Genome Browser). Зонд CEP 7 направлен на выявление альфа-сателлитной последовательности D7Z1, расположенной на центромере хромосомы 7.





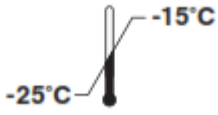
РЕАГЕНТЫ

1.Зонды Vysis LSI D7S522 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen (серия № 30-191038) (1 флакон, 20 мкл/флакон). 225 нг/мкл, ДНК-зонд, меченный флуорофором, и заливка ДНК в Tris-EDTA.

2. **Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP (серия № 30-804826)** (1 флакон, 150 мкл/флакон), сульфат декстрана, формамид и SSC (pH 7.0).

Сертификаты безопасности всех реагентов находятся в отделе технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Условия хранения



Зонды Vysis D7S522 /CEP7 следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) и беречь от света.

Условия транспортировки

Во время транспортировки зонд Vysis D7S533 /CEP 7 обкладывают сухим льдом. Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD Предназначен только для диагностики *in vitro*.

Vysis LSI D7S522 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[6], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[7], CLSI документ M29-A3[8], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[9].

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство[8].

Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[9]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.
Применяются следующие предупреждения

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC
Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью HCl доведите его до 5.3. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор
Тщательно растворите 100 мл 20X SSC (pH 5.3) в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0 ± 0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Денатурационный раствор (70 % формамида/2X SSC)
В стеклянном сосуде Коплина тщательно растворите 49 мл формамида и 7 мл 20X SSC (pH 5.3) в 14 мл дистиллированной воды. Для измерения pH (норма 7.0 – 8.0) используйте индикаторные полоски. Хранить при температуре 2 – 8°C. Срок хранения – 7 дней.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)
Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

0.4X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор для быстрого промывания
Тщательно растворите 20 мл 20X SSC (pH 5.3) в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH доведите его до 7.0-7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Хранение ДНК-зонда LSI: ДНК-зонд LSI следует хранить при температуре не выше –20°C (±5°C) и беречь от света. **Разрушение:** под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Клетки костного мозга и периферической крови необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

Процедура
Необходимые материалы (в комплекте)
- Зонды Vysis LSI D7S522 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen
- Гибридизационный буфер Vysis LSI/WCP

Необходимые материалы (не в комплекте)
- 12N HCl (для доведения pH промывочных растворов до нужного уровня)
- 1N NaOH (для нужного pH промывочных растворов до нужного уровня)
- Стеклянные сосуды Коплина
- Калиброванный термометр
- Пинцет
- Градуированный цилиндр 1000 мл
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозаторы (1 – 10 мкл)
- Пипеттор (1 -10 мкл)
- pH-метр
- Чистые стеклянные предметные стекла
- Дистиллированная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат (37°C)
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид ультравысокой очистки
- Контрастирующий краситель DAPI II

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

● Подогревательный столик

Подготовьте три сосуда Коплина: в первый сосуд налейте 70 мл 100 % этанола, во второй – 70 мл 85 % раствора этанола и в третий – 70 мл 70 % раствора этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 7 дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора). Для получения хороших результатов убедитесь в том, что приготовление и использование реагентов происходит при нужной температуре. Измерьте температуры растворов, находящихся в сосудах Коплина; при необходимости используйте калиброванный термометр. Для определения качества реагентов при выполнении гибридизации, в ходе которой применяются зонды CEP® и LSI, используйте общий метод LSI.

Подготовка образца

ПРИМЕЧАНИЕ: сосуды Коплина с денатурационными растворами оставьте при температуре окружающей среды. Перед использованием поместите сосуды на водяную баню (73±1ºC) примерно на 30 минут.

1. Убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1ºC.
2. Погрузите микропрепараты в денатурационный раствор примерно на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: одновременно можно погрузить не более 4 микропрепаратов.

3. Обработайте микропрепараты 70 % раствором этанола (1 мин.), затем 85% раствором этанола (1 мин.) и 100 % этанолом (1 мин.).

ПРИМЕЧАНИЕ: микропрепараты можно вынуть из 100 % этанола только после того, как Вы будете готовы их высушить и нанести смесь зонда.

Приготовление смеси зонда

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:

7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.**

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. Поместите пробирку на водяную баню (73±1ºC) на 5 минут.
5. Снимите пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирку на подогревательный столик (45–50ºC). Когда Вы будете готовы нанести зонд на исследуемую ДНК, пробирку со столика можно снять.

ПРИМЕЧАНИЕ: если к моменту денатурации зонда микропрепараты уже готовы, Вы можете сразу нанести зонд на ДНК.

Гибридизация зонда в исследуемый образец

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовьте увлажненную коробку: на боковую стенку воздухонепроницаемого контейнера положите бумажное полотенце, смоченное водой. Коробку поместите в термостат (37ºC).

1. Извлеките микропрепараты из 100 % этанола.
2. Возьмите микропрепарат через бумагу и высушите его с помощью бумажного полотенца.
3. Для выпаривания остатков этанола поместите микропрепарат на подогревательный столик (45 - 50ºC).
4. На один исследуемый участок нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для дополнительных исследуемых участков.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.
6. Поместите микропрепараты в предварительно прогретую увлажненную коробку, а коробку поместите в термостат (37ºC) на 6–16 ч.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для того чтобы получить хорошие результаты, для большинства зондов LSI начинайте с гибридизации в течение 12–16 ч.

Промывание микропрепарата: процедура быстрого промывания

ПРИМЕЧАНИЕ: для образцов, залитых в парафин, промывочный раствор 0.4XSSC/0,3 % NP-40 замените раствором 2X SSC/0,3 % NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40. Перед использованием поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC) не менее чем на 30 минут. Срок хранения – 1 день.
- В сосуд Коплина налейте 70 мл раствора 2XSSC/0,3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.

ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания температуры раствора 0.4XSSC/0,3 % NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

Отсчет времени начинается после того, как Вы опустите последнее стекло.

1. Удалите покровное стекло с одного микропрепарата и немедленно опустите его в раствор 0.4X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,3 % NP-40. Поболтайте в течение 1–3 секунд. Извлеките микропрепараты через 5 секунд – 1 минуту.

Визуализация гибридизации

1. Высушите микропрепарат на воздухе в темноте.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом.

Просмотрите микропрепараты с помощью подходящего фильтра, установленного на флуоресцентный микроскоп с оптимальной разрешающей способностью. Флуорофоры, использованные при гибридизации, позволяют визуализировать следующие оптические фильтры.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
DAPI/Orange	флуорофоров DAPI и SpectrumOrange™
DAPI/Green	флуорофоров DAPI и SpectrumGreen™
Aqua/Green/Orange	флуорофоров SpectrumAqua™, SpectrumGreen и SpectrumOrange™
DAPI/Orange/Green	флуорофоров DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	флуорофоров DAPI,SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange

Хранение: изучение микропрепаратов, хранившихся в защищенном от света месте при температуре -20°C (±5°C), проводится не менее чем через 3 недели после гибридизации.

Совместная денатурация

Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепараты (с нанесенными зондами и покровными стеклами) помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

HYBrite™. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации
1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды
ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.
2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Встряхните и центрифугируйте еще раз.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации
Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite™. Более подробная информация представлена в руководстве по использованию системы.

Также можно использовать систему денатурации/гибридизации ThermoBrite™, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1ºC), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73ºC, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73ºC и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37ºC, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.

Ограничения при использовании
Для каждой лаборатории должны быть разработаны критерии проверки изменений при проведении теста.
Если при анализе наблюдаются нарушения, следует тщательно пересмотреть полученный результат, используя фильтр.
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных[5].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ожидаемые результаты

Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью зонда D7S522/CEP 7 FISH приведет к появлению двух оранжевых и двух зеленых сигналов. Если в ядре присутствует лишь один из гомологов (моносомия), это приведет к появлению одного оранжевого и одного зеленого сигналов. При изучении других патологических образцов можно получить другие результаты. Для оценки подобных результатов можно использовать метафазный анализ.[5]

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3 % NP-40 на 2ºC. При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 70 - 73ºC.
Диффузный сигнал (образование спекл-структур)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76ºC.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2ºC. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1 % параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70 % формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C.
3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.
4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку.
5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты.
6. Удалите покровное стекло.
7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Прежде чем проводить оценку результатов FISH убедитесь в том, что Ваш микроскоп стоит ровно и нормально функционирует. В приведенной ниже таблице перечислены не совсем удовлетворительные результаты, которые Вы можете получить при использовании зондов LSI, а также их причины и советы по улучшению качества анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
«Искаженная» морфология хромосомы	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационнного раствора составляет 73 ± 1ºC; уменьшите температуру до 72ºC. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4ºC. Срок хранения – 7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов – 1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0 – 8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Отсутствие сигнала или слабый сигнал	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73 ± 1ºC. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74ºC. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2 – 4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45 - 50ºC) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Зонд не добавлен.	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера: 1 мкл зонда : 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
Зонд денатутирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73 ± 1ºC.
ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100 % этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73 ± 1ºC) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45 – 50ºC). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Высушенные негибридизированные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20ºC (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизированные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20ºC в течение 3 недель.
Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37ºC. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1 % NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70 % и 85 % растворах этанола и 100 % этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список № 06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20ºC и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, et al. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2007;137(3):193-205.
2. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002;100(13):4325-4336.
3. Li X, Wu L, Ying S, et al. Differentiation and hematopoietic-support of clonal cells in myelodysplastic syndromes *Leuk Lymphoma*. 2007; 48(7):1353-1371.
4. Abdelrazik HN, Farawila HM, Sherif MA, et al. Molecular characterization of chromosome 7 in AML and MDS patients. *Afr J*
Health Sci. 2006;13(3-4):33-42.
5. 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.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. Washington,
DC: US Government Printing Office, December 2009. [Also available online: *Type* > www.cdc.gov, *search* > BMBL5 > *look up* sections III and IV.]
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP и Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2009, 2020 Abbott. Все права защищены.
www.abbottmolecular.com
Май 2020 г.
30-608465/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

/Логотип/ PathVysion
Набор ДНК-зондов HER-2
DNA Probe Kit II

RU

ИСХ. № 06N46
30-608493/R6

PathVysion
Набор ДНК-зондов HER-2 DNA Probe Kit II
ИСХ. № 06N46
30-608493/R6

Описание используемых символов

	Производитель
ИСХ. №	Исходный номер
ПАРТИЯ	Номер партии
Диагностика in-vitro	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Содержит достаточное количество тестов
	Ограничение температур
	Ограничение температур
	Биологическая опасность
	Опасность
	Опасность
	Опасность
	Опасность
	См. руководство по эксплуатации
	Использовать до
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Набор ДНК-зондов PATHVYSION HER-2 DNA PROBE KIT II
Номер по списку 06N46-030 (20 тестов)/
Номер по списку 06N46-035 (50 тестов)/
Номер по списку 06N46-036 (100 тестов)/

ПРЕДУСМОТРЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Набор ДНК-зондов PathVysion HER-2 DNA Probe Kit II (PathVysion Kit II) предназначен для определения амплификации гена HER-2/*neu* посредством флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в зафиксированных формалином и залитых парафином образцах ткани молочной железы и желудка человека.

Результаты, полученные при использовании набора PathVysion Kit II по показанию рак молочной железы, предназначены для использования в качестве дополнения к существующей клинической и патологической информации, которая в настоящее время используется в качестве прогностических факторов у пациентов с раком молочной железы стадии II с поражением лимфатических узлов. Набор PathVysion Kit II также показан в качестве вспомогательного средства для прогнозирования выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости у пациентов с раком молочной железы стадии II с поражением лимфатических узлов, получавших адъювантную химиотерапию циклофосфамидом, доксорубицином и 5-фторурацилом (CAF). Набор PathVysion II показан в качестве вспомогательного средства при оценке пациентов с раком молочной железы, для которых рассматривается возможность лечения препаратом HERCEPTIN® (трастузумаб) (см. листок-вкладыш к препарату HERCEPTIN).

Предупреждение:

Следующее предупреждение относится только к показанию использования набора PathVysion Kit II при лечении рака молочной железы.

Выбор терапии препаратом HERCEPTIN

ПРИМЕЧАНИЕ. Все пациенты, участвовавшие в клинических исследования препарата HERCEPTIN, были отобраны с использованием исследуемого иммуногистохимического анализа (анализ, валидированный для клинических исследований [CTA]). Ни один из пациентов в этих исследованиях не был выбран с использованием теста PathVysion. Тест PathVysion сравнивали с CTA на подмножестве образцов, полученных в клинических исследованиях. Было обнаружено, что он дает приемлемо согласующиеся результаты. Фактическая корреляция теста PathVysion с клиническими исходами, отмеченными при приеме препарата HERCEPTIN в проспективных клинических исследованиях, не установлена.

Выбор адъювантной терапии

Тест PathVysion не предназначен для использования с целью скрининга или диагностики рака молочной железы. Он предназначен для использования в качестве дополнения к другим прогностическим факторам, в настоящее время используемым для прогнозирования выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости у пациентов с раком молочной железы стадии II с поражением лимфатических узлов, а решение о неиспользовании лечения у пациентов с раком молочной железы стадии II с поражением лимфатических узлов должно быть основано только на статусе амплификации гена HER-2/*neu*. Некоторым пациентам с раком молочной железы, у которых не было выявлено амплификации гена HER-2/*neu*, все же может быть полезна адъювантная терапия циклофосфамидом, доксорубицином, 5-фторурацилом (CAF) на основе других прогностических факторов, которые предсказывают неблагоприятный исход (например, размер опухоли, количество пораженных лимфатических узлов и гормон-рецепторный статус). И наоборот, отобранные пациенты с раком молочной железы, у которых была выявлена амплификация гена, не могут быть кандидатами на лечение CAF из-за ранее существовавших или сопутствующих заболеваний.

Требуемое обучение

Abbott Molecular проведет обучение по подготовке образцов, процедуре анализа и интерпретации результатов FISH-тестирования гена HER-2/*neu* для неопытных пользователей. Также рекомендуется, чтобы лаборатория, которая ранее проходила обучение, но теперь имеет новый персонал, выполняющий анализ, запросила обучение для новых пользователей.

ОБЗОР И ПОЯСНЕНИЯ

В 2008 году рак молочной железы был самым распространенным раком (22,9%/1 384 155) и самой частой причиной смерти от рака (13,7%/458 503) среди женщин во всем мире.[1] Рак желудка был четвертым самым распространенным раком (9,7%/640 031) и третьей наиболее частой причиной смерти у мужчин (11,0%/463 930), а также был пятым самым распространенным раком (5,8%/348 571) и пятой наиболее частой причиной смерти у (8,2%/273 489) у женщин.[1]

Рак молочной железы

После операции рак молочной железы с поражением подмышечных лимфатических узлов, на которые приходится 30% всех случаев рака молочной железы,[2] связан с более короткой выживаемостью без признаков заболевания[3,4] и более короткой общей выживаемостью[5], чем рак молочной железы без поражения лимфатических узлов. Считается, что пациентам с раком молочной железы и поражением подмышечных лимфатических узлов при постановке диагноза следует предлагать адъювантное системное лечение.

Было доказано, что амплификация или сверхэкспрессия гена HER-2/*neu* (ERBB2) является индикатором плохого прогноза при раке молочной железы с поражением лимфатических узлов.[6-10] В одном исследовании прогностическая ценность статуса HER-2/*neu*, по-видимому, больше среди пациентов, получавших химиотерапию.[7]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Однако при прогнозировании выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости у отдельных пациентов необходимо также учитывать другие установленные прогностические факторы, такие как размер опухоли, количество пораженных лимфатических узлов и гормон-рецепторный статус.

Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) использовался для обнаружения амплификации гена HER-2/*neu* в клеточных линиях карциномы молочной железы человека как в интерфазных, так и в метафазных клетках.[11-14] Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), по-видимому, является альтернативным методом, способным преодолеть многие из присущих им технических и интерпретационных ограничений других методов, таких как иммуногистохимия.[15] Для количественного определения амплификации гена HER-2/*neu* FISH позволяет оценить не только уровень амплификации гена HER-2/*neu* непосредственно в опухолевых клетках, сохраняя характерную морфологию исследуемой ткани, но также и пространственное распределение копий онкогенов в отдельных первичных карциномах молочной железы.

Рак желудка

Амплификация или сверхэкспрессия гена HER-2/*neu* была продемонстрирована у 22% пациентов с распространенным раком желудка, прошедших скрининг на статус HER-2/*neu*.[16]

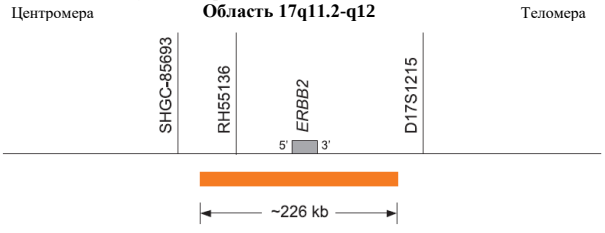
Для количественного определения амплификации гена HER-2/*neu* FISH позволяет оценить не только уровень амплификации гена HER-2/*neu* непосредственно в опухолевых клетках, сохраняя характерную морфологию исследуемой ткани, но также и пространственное распределение копий онкогенов в отдельных первичных карциномах молочной железы.

Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) использовался для обнаружения амплификации гена HER-2/*neu* в клеточных линиях карциномы желудка человека.[16-19] Кроме того, статус HER-2/*neu* в первичных и парных метастатических участках аденокарциномы желудка показал высокую согласованность по FISH. Это говорит о том, что при раке желудка статус HER-2/*neu* в большинстве случаев во время метастатического процесса не изменяется.[19]

ОСНОВЫ ПРОЦЕДУРЫ

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) - это метод, позволяющий визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот в клеточном препарате. В частности, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) для ДНК включает в себя точный отжиг одноцепочечного, меченного флуорофором ДНК-зонда до последовательностей-мишеней комплементарного гена. Гибридизация зонда с центром клеточной ДНК видна при прямом обнаружении с помощью флуоресцентной микроскопии. ДНК-зонд Locus Specific Identifier (LSI) HER-2/*neu* представляет собой флуоресцентный ДНК-зонд SpectrumOrange (SO) размером примерно 226 т.п.н., специфичный для локуса гена HER-2/*neu* (17q11.2-q12). ДНК-зонд Chromosome Enumeration Probe (CEP) 17 представляет собой флуоресцентный ДНК-зонд SpectrumGreen (SG) размером приблизительно 5,4 т.п.н., специфичный для последовательности альфа-сателлитной ДНК в центромерной области хромосомы 17 (17p11.1-q11.1). Для простоты использования зонды предварительно смешивают и предварительно денатурируют в буфере для гибридизации. Немеченая блокирующая ДНК также включена в зонды для подавления последовательностей, содержащихся в целевых локусах, являющихся общими для других хромосом. Набор PathVysion Kit II предназначен для обнаружения амплификации гена HER-2/*neu* в зафиксированных формалином и залитых парафином (FFPE) образцах ткани молочной железы и желудка человека методом FISH.

Зафиксированные формалином и залитые парафином образцы ткани помещают на стекла. Образцы проходят серию этапов предварительной химической и ферментативной обработки для повышения доступности ДНК для гибридизации. ДНК денатурируют до одноцепочечной формы, а затем проводят гибридизацию с зондами. После гибридизации свободный зонд удаляется серией промывок, а ядра окрашиваются при помощи DAPI (4',6 диамидино-2-фенилиндол), ДНК-специфичным окрашивающим средством, которое флуоресцирует синим цветом. Гибридизацию зондов наблюдают под флуоресцентным микроскопом, оснащенном соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссионными фильтрами, позволяющими визуализировать оранжевые и зеленые флуоресцентные сигналы. Подсчет сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 проводится путем микроскопического исследования ядра, которое дает отношение гена HER-2/*neu* к количеству копий хромосомы 17.



Зонд LSI HER-2/neu (ERBB2) SpectrumOrange

17p11.1-q11.1 CEP 17
alpha satellite
SpectrumGreen

17q11.2-q12 LSI
N HER-2/*neu* (ERBB2)
SpectrumOrange

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Диагностика in vitro Медицинское изделие для диагностики in vitro.

1. Для использования при диагностике in vitro
2. Набор PathVysion II предназначен для использования только с зафиксированными формалином и залитыми парафином (FFPE) раковых тканей молочной железы и желудка. Его не следует использовать с раковыми тканями, не являющимися тканями молочной железы, желудка или свежими раковыми тканями.
3. Все биологические образцы должны рассматриваться как способные передавать возбудителей инфекции. Контрольные стекла ProbeChek HER-2/*neu* производят из линий клеток человека, зафиксированных 10% формалином. Поскольку зачастую невозможно определить, какой из них может быть заразным, все человеческие образцы и контрольные предметные стекла должны быть обработаны с соблюдением универсальных предосторожностей.[21]
4. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или очень высоких температур. Такие условия, как известно, повреждают ДНК и могут привести к сбою анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).
5. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и обнаружения стекол может привести к неприемлемым или ошибочным результатам.
6. Для определения целевых областей окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) следует проводить на каждом 10-м стекле одного и того же тканевого блока.
7. На условия гибридизации может отрицательно повлиять использование реагентов, отличных от предоставленных компанией Abbott Molecular.
8. Правильное хранение компонентов набора необходимо для обеспечения указанного срока годности. На результаты анализа могут отрицательно повлиять компоненты набора, хранящиеся в других условиях.
9. При хранении при низких температурах 20X SSC может кристаллизоваться. Если кристаллы не повторно растворяются при комнатной температуре, раствор следует отбросить.
10. Если какие-либо другие рабочие реагенты выпадают в осадок или становятся мутными, их следует отбросить и приготовить свежие растворы.
11. Флуорофоры можно фотообесцвечивать под воздействием света. Чтобы ограничить эту деградацию, работайте со всеми растворами, содержащими флуорофоры, при пониженном освещении. Сюда входят все шаги, связанные с использованием гибридизированного стекла. Выполняйте все действия, не требующие освещения для манипуляций (инкубационные периоды, промывки и т.д.) в темноте.
12. Смесь ДНК-зондов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 содержит формамид, который является тератогеном. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
13. Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов и водяных ванн.
14. Всегда проверяйте температуру раствора для предварительной обработки, раствора для денатурации и промывочных буферных растворов перед каждым использованием, измеряя температуру раствора в емкости Коплина с помощью калиброванного термометра.
15. Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с руководящими документами учреждения по утилизации опасных отходов.

Зонды PathVysion LSi hER-2/neu Spectrumorange/CEP 17 SpectrumGreen

ВНИМАНИЕ: Этот препарат содержит компоненты человеческого происхождения и/или компоненты потенциальных возбудителей. Ни один известный метод испытаний не может дать полной гарантии того, что продукты, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не передадут инфекцию. Эти реагенты и человеческие образцы должны обрабатываться как инфекционные с использованием безопасных лабораторных процедур, описанных в разделе «Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях»,[20] стандартах OSHA по переносимым с кровью патогенам,[21] документе Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) M29-A3,[22] и других соответствующих практических руководствах по биологической безопасности.[23] Поэтому все материалы, полученные от человека, должны считаться инфекционными.

Сюда входят следующие меры предосторожности, но не ограничиваясь ими:

- При работе с образцами или реагентами надевайте перчатки.
- Не пипетировать ртом.
- Не есть, не пить, не курить, не наносить косметику и не пользоваться контактными линзами в тех местах, где используются данные материалы.
- Очистите и продезинфицируйте розливы образцов, используя туберкулоцидное дезинфицирующее средство, такого как 1,0% гипохлорит натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.20

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Обеззараживайте и утилизируйте все потенциальные возбудители инфекции в соответствии с местными, государственными и федеральными нормами.[23]

PathVysion LSI HER-2/*neu* SpectrumOrange/CEP 17
Зонды SpectrumGreen (продолжение)

Компоненты маркировки, определяющие опасность: Формамид

Опасность	
H360	Может повлиять на фертильность или навредить нерожденному ребенку.
P201	Перед использованием получите специальные инструкции.
P202	Не используйте устройство до тех пор, пока не будут прочитаны и изучены все меры предосторожности.
P280	Надевать защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз.
P308+P313	При воздействии или потенциальном воздействии: Обратиться за медицинской помощью.
P405	Хранить под замком.
P501	Этот материал и его контейнер должны быть утилизированы безопасным способом.

NP-40

Компоненты маркировки, определяющие опасность:
Полиэтиленгликоль октилфениловый эфир

Опасность	
H302	Опасно при проглатывании.
H315	Вызывает раздражение кожи
H318	Вызывает серьезное повреждение глаз.
H411	Токсично для водных организмов. Последствия будут продолжительными.
P280	Надевать защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз.
P264	После использования тщательно мыть руки.
P273	Не допускать попадания в окружающую среду.
P305+ P351+ P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промывайте водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы при их наличии и при возможности. Продолжайте промывать.
P301+ P312	ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: При плохом самочувствии обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/ к врачу.
P501	Утилизируйте содержимое / контейнер в соответствии с местными нормативами.

Паспорт безопасности: Важная информация, касающаяся безопасного обращения, транспортировки и утилизации данного продукта, содержится в Паспорте безопасности.

РЕАГЕНТЫ И ПРИБОРЫ

Предоставляемые материалы

Этот набор содержит достаточное количество реагентов для обработки 20, 50 или 100 тестов в зависимости от заказанного продукта. Тест определяют как одна
целевая область 22 мм x 22 мм.

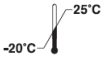
1. Зонды Vysis LSI HER-2/*neu* SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen
Номер по каталогу: 30-171062/35-171062
Количество: 200 мкл/500 мкл/500 мкл x 2 для набора из 100 тестов
Состав: 20 нг/мкл меченого флуорофором альфа-сателлитного ДНК-зонда SpectrumGreen для хромосомы 17, 10 нг/мкл меченого флуорофором ДНК-зонда SpectrumOrange для локуса гена HER-2/*neu* и блокирующей ДНК, предварительно денатурированной в буфере для гибридизации.

2. Контрастный краситель DAPI
Номер по каталогу: 30-804960
Количество: 1000 мкл
Состав: 1000 нг/мл DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) в фенилендиамина дигидрохлориде, глицерине и буфере.

3. NP-40
Номер по каталогу: 30-804820
Количество: 2000 мкл x 2
Состав: Игепал (заменитель NP-40) (Октилфенокси) полиэтоксиэтанол.

4. Стандартный солевой раствор (20X SSC)
Номер по каталогу: 30-805850
Количество: 66 г
Состав: Хлорид натрия и цитрат натрия

Хранение и обработка



Храните невскрытый набор ДНК-зондов PathVysion HER-2 II в сборе при -20°C, в защищенном от света месте.

Стандартный солевой раствор (20X SSC) и NP-40 можно хранить отдельно при комнатной температуре (от 15 до 30°C). Срок годности каждого из компонентов указан на этикетках отдельных компонентов. Эти условия хранения распространяются как на вскрытые, так и на невскрытые компоненты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Требуемые, но не предоставляемые материалы

Лабораторные реагенты

- Нормальные контрольные стекла ProbeChek HER-2/*neu* (нормальное отношение сигналов), номер по каталогу 30-805093, номер по списку 02J05-030 (ручной анализ) или номер по каталогу 32-805093, номер по списку 02J05-010 (для использования с системой Vysis AutoVysion); зафиксированные формалином, залитые парафином культивированные раковые клетки молочной железы человека (нормальное отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17), нанесенные на предметные стекла микроскопа. Количество: 5 стекол. Храните контрольные стекла при температуре от 15 до 30°C в закрытом контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности.
- Контрольные стекла ProbeChek HER-2/ *neu* Cutoff (отношение слабоусиленного сигнала) номер по каталогу 30-805042, номер по списку 02J04-030 (ручной анализ) или номер по каталог 32-805042, номер по списку 02J04-010 (для использования с системой Vysis AutoVysion); зафиксированные формалином, залитые парафином культивированные раковые клетки молочной железы человека (низкий уровень амплификации HER-2/*neu*), нанесенные на предметные стекла микроскопа. Количество: 5 стекол. Храните контрольные стекла при температуре от 15 до 30°C в закрытом контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности.
- Набор реагентов для предварительной обработки парафином Vysis (номер по каталогу 32-801200, номер по списку 02J02-032), который включает:
  - Раствор для предварительной обработки Vysis (NaSCN); Количество: 5 x 50 мл
  - Протеаза Vysis Protease (пепсин) Количество: 5 x 25 мг
  - Протеазный буфер Vysis Protease Buffer (раствор NaCl, pH 2,0);
  - Количество: 5 x 50 мл
  - Промывочный буфер Vysis (2X SSC, pH 7,0); Количество: 2 x 250 мл
- Забуференный нейтральный раствор формалина (4% формальдегида в ФСБ)
- Осветляющий агент Hemo-De (или аналог, например, d-лимонен)
- Гематоксилин и эозин (H&E)
- Иммерсионное масло, подходящее для флуоресцентной микроскопии. Хранить при комнатной температуре (от 15 до 30°C).
- Формамид, высокой очистки
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированный (12 н.) раствор хлористоводородной кислоты (HCl)
- 1 н. раствор гидроксида натрия (NaOH)
- Вода очищенная (дистиллированная, деионизированная или качества Milli-Q); хранить при комнатной температуре.
- Каучуковый клей
- Драйерит

ПРИМЕЧАНИЕ. Если условия хранения не указаны, храните реагенты в соответствии с рекомендациями поставщика.

Лабораторное оборудование

- Предварительно очищенные силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Столик с подогревом (45–50°C)
- Покровное стекло 22мм x 22мм
- Микролитровая пипетка (от 1 до 10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0,5 или 1,5 мл)
- Таймер
- Микротом
- Магнитное перемешивающее устройство
- Вихревая мешалка
- Микроцентрифуга
- Мерный цилиндр
- Водяные бани (37 ± 1°C, 72 ± 1°C и 80 ± 1°C)
- Безбелковая водяная баня (40°C)
- Воздушные инкубаторы (37°C и 56°C)
- Скрейбер с алмазным наконечником
- Увлажненная камера для гибридизации
- Пинцеты
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (6). Предлагаемый тип: вертикальный сосуд для окрашивания
- Флуоресцентный микроскоп с рекомендованными фильтрами (см. следующий раздел)
- pH-метр
- Калиброванный термометр
- Коробка с предметными стеклами с крышкой
- Блок фильтрации с порами размером 0,45 мкм

Микроскопическое оборудование и принадлежности

Микроскоп: Для просмотра результатов гибридизации необходим флуоресцентный микроскоп с осветителем отражённого света. Микроскоп должен быть проверен, чтобы убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальный осмотр образцов при анализе флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) Микроскоп, используемый для обнаружения общих следов ДНК, таких как DAPI, йодид пропидия и квинакрин, может работать неправильно для анализов флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Рекомендуется регулярная очистка микроскопа и периодическое техническое обслуживание, особенно выравнивание ртутной лампы, техническим представителем изготовителя.

ПРИМЕЧАНИЕ: часто предполагаемый отказ реагентов в анализе in situ может фактически указывать на то, что для просмотра успешно проведенного анализа на гибридизацию используется неисправный или неоптимальный флуоресцентный микроскоп или неправильный набор фильтров.

Источник света возбуждения: Рекомендуемым источником возбуждения является 100-ваттная ртутная лампа или другая лампа с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Регистрируют количество часов, в течение которых использовалась лампа, и заменяют ее до того, как номинальное время работы будет превышено. Убеждаются, что лампа правильно выровнена.

Объективы: Используйте масляные иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75 при использовании микроскопа со 100 - ваттной ртутной лампой или другой лампой с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Объектив с 25-кратным увеличением в сочетании с окулярами 10-кратного увеличения подходит для определения местоположения цели. Объектив с 40-кратным увеличением в сочетании с окулярами 10-кратного увеличения подходит для сканирования. Удовлетворительные результаты определения числа сигналов FISH могут быть получены с помощью масляного погружного ахроматического объектива с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: Иммерсионное масло, используемое с масляными иммерсионными объективами, должно быть предназначено по составу для низкой автофлуоресценции и специально для использования в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры: Наборы многополосных флуоресцентных фильтров для микроскопов, оптимизированные для использования с PathVysion Kit II, можно приобрести у компании Abbott Molecular для большинства моделей микроскопов. Рекомендуемые наборы фильтров для PathVysion Kit II: DAPI/9-Orange с двойной полосой пропускания, DAPI/Green с двойной полосой пропускания, Green/Orange (V.2) с двойной полосой пропускания и DAPI/Green/Orange (V.2) с тройной полосой пропускания. Гибридизация зондов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 с их целевыми областями отмечена оранжевой и зеленой флуоресценцией соответственно. Вся остальная ДНК будет флуоресцировать синим цветом с окрашиванием DAPI.

Приготовление рабочих реагентов.

Стандартный солевой раствор (20X SSC) (3M хлорид натрия, 0,3 M цитрат натрия, pH 5,3)

Для приготовления объединяют:

66 г	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
200 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Доводят pH до 5,3 с помощью концентрированной HCl. Доводят до 250 мл водой очищенной. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,45 мкм. Хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Денатурирующий раствор (70% формамид/2X SSC, pH от 7,0 до 8,0)

Для приготовления объединяют:

49 мл	формамид
7 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC), pH 5,3
14 мл	вода очищенная
70 мл	конечный объем

Тщательно перемешивают. pH измеряют при комнатной температуре с помощью pH-метра со стеклянным pH-электродом, чтобы убедиться в том, что значение pH находиться в диапазоне от 7,0 до 8,0. Этот раствор можно использовать в течение не более 1 недели. Значение pH проверяют перед каждым использованием. Когда не используют, хранят при температуре от 2 до 8°C в плотно закрытом контейнере.

Растворы этанола

Готовят разведения об/об 70%, 85% и 100% этанола, используя 100% этанол и очищенную воду. Растворы можно использовать в течение 1 недели до тех пор, пока не будет отмечено испарение или раствор не станет слишком разбавленным из-за чрезмерного использования. Когда не используют, хранят при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах.

Промывочный буфер после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40)

Для приготовления объединяют:

100 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC), pH 5,3
847 мл	вода очищенная
3 мл	NP-40

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Довести pH регулируют до 7,0-7,5 с помощью 1 н. раствора NaOH. Объем доводят до 1 литра водой очищенной. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,45 мкм. Использованный раствор выбрасывают в конце каждого дня. Неиспользованный раствор хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

Отбор и обработка образцов

Набор PathVysion Kit II предназначен для использования с зафиксированными формалином и залитыми парафином образцами тканей. Сбор тканей должен выполняться в соответствии со стандартными лабораторными процедурами. **Выбор участка ткани для анализа PathVysion ii должен производится патологом**. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или очень высоких температур. Такие условия, как известно, повреждают ДНК и могут привести к сбою анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ткань молочной железы следует готовить в виде срезов толщиной от 4 до 6 мкм. Зафиксированную формалином и залитую парафином ткань можно использовать и хранить в соответствии со стандартными лабораторными процедурами. Для обеспечения оптимальных результатов при использовании набора PathVysion Kit II, эти методы должны быть согласованы по всем анализируемым образцам. Для определения целевых областей окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) следует проводить на каждом 10-м стекле одного и того же тканевого блока. Срезы тканей следует размещать на положительно заряженной стороне предметного стекла с органосилановым покрытием, чтобы минимизировать отделение ткани от предметного стекла во время проведения анализа методом FISH. Набор PathVysion Kit II содержит реагенты, достаточные примерно для проведения 20, 50 или 100 тестов. Один тест для набора PathVysion Kit II определяется как площадь 22 мм x 22 мм. Для больших срезов образцов потребуется более 10 мкл зонда на тест.

Приготовление предметного стекла из зафиксированной формалином и залитой парафином ткани

Для приготовления предметных стекол из зафиксированных формалином и залитых парафином образцов тканей можно использовать следующий метод:

1. С помощью микротома нарезают парафиновые срезы толщиной от 4 до 6 мкм.
2. Срезы помещают на безбелковую водяную баню при температуре 40°C.
3. Срез помещают на положительно заряженную сторону предметного стекла с органосилановым покрытием.
4. Предметным стеклам дают высохнуть на воздухе.

(Обработку контрольных предметных стекол ProbeChek hER-2/*neu* начинают здесь.)

5. Предметные стекла высушивают в течение ночи при температуре 56°C.

Подготовка предметных стекол

Перед анализом с использованием набора PathVysion Kit II необходимо удалить парафин с предметных стекол и зафиксировать образцы. Листок-вкладыш в набор реагентов для предварительной обработки парафином Vysis (номер по каталогу 32-801200, номер по списку 02J02-032) содержит подробные инструкции. Ниже приводится краткое описание процедуры.

Депарафинирование предметных стекол

- Предметные стекла погружают в осветляющий агент Hemo-De на 10 минут при комнатной температуре.
- Повторяют дважды, каждый раз используя новый Hemo-De.
- Предметные стекла обезвоживают в 100% этаноле в течение 5 минут при комнатной температуре. Повторяют.
- Предметные стекла высушивают на воздухе или предметные стекла помещают на столик с подогревом при температуре от 45 до 50°C.

Предварительная обработка стекол

- Предметные стекла погружают в 0,2 н. раствор HCl на 20 минут.
- Предметные стекла погружают в воду очищенную на 3 минуты.
- Предметные стекла погружают в промывочный буфер на 3 минуты.
- Предметные стекла погружают в раствор для предварительной обработки при температуре 80°C на 30 минут.
- Предметные стекла погружают в воду очищенную на 1 минуту.
- Предметные стекла погружают в промывочный буфер на 5 минуты. Повторяют.

Обработка протеазой

- Излишки буфера удаляют, промокнув края предметных стекол бумажным полотенцем.
- Предметные стекла погружают в раствор протеазы при температуре 37°C на 10-60 минут.
- Предметные стекла погружают в промывочный буфер на 5 минуты. Повторяют.
- Предметные стекла высушивают на столике с подогревом при температуре от 45 до 50°C в течение 2-5 минут.

Фиксация образца

- Предметные стекла погружают в забуференный нейтральный формалин при комнатной температуре на 10 минут.
- Предметные стекла погружают в промывочный буфер на 5 минуты. Повторяют.
- Предметные стекла высушивают на столике с подогревом при температуре от 45 до 50°C в течение 2-5 минут.
- Переходят к протоколу анализа PathVysion Kit II.

МЕТОДИКА АНАЛИЗА

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU

Подготовка зонда

1. Дают зонду нагреться до комнатной температуры, чтобы вязкость достаточно снизилась для обеспечения точного дозирования.
2. Перемешивают на вортексе. Каждую пробирку центрифугируют в течение 2-3 секунд в настольной микроцентрифуге, чтобы опустить содержимое на дно пробирки. Осторожно перемешивают на вортексе.

Денатурация ДНК образца

Время приготовления растворов зондов следует тщательно согласовывать с денатурацией ДНК образца, чтобы оба образца были готовы к стадии гибридизации одновременно.

1. Предварительно нагревают увлажненную камеру для гибридизации (герметичный контейнер с куском влажной промокательной бумаги или бумажным полотенцем размером примерно 1 x 3 дюйма, приклеенным к боковой стороне контейнера) до 37°C, поместив его в инкубатор при 37°C перед приготовлением предметных стекол. Смачивают промокательную бумагу или бумажное полотенце водой перед каждым использованием камеры для гибридизаци.
2. Перед использованием следует убедиться в том, что pH денатурирующего раствора составляет от 7,0 до 8,0 при комнатной температуре. Денатурирующий раствор добавляют в сосуд Коплина и помещают на водяную баню при температуре 72 ± 1°C не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 72 ± 1°C. Перед использованием температуру раствора проверяют.
3. Участки, которые необходимо гибридизовать, помечают скрейбером с алмазным наконечником.
4. Денатурируют ДНК образца, погружая подготовленные предметные стекла в денатурирующий раствор при температуре 72 ± 1°C (≤ 6 предметных стекол на сосуд) на 5 минут. Не следует денатурировать более 6 предметных стекол на сосуд Коплина за один раз.
   ПРИМЕЧАНИЕ. Температуру раствора проверяют перед каждым использованием.
5. Предметные стекла удаляют пинцетом из денатурирующего раствора и немедленно помещают в 70%-ный промывочный раствор этанола при комнатной температуре. Предметное стекло встряхивают, чтобы удалить формамид. Дают постоять в промывочном растворе этанола в течение 1 минуты.
6. Предметные стекла вынимают из 70% этанола. Повторите шаг 5 с 85% этанолом, а затем со 100% этанолом.
7. Излишки этанола сливают с предметного стекла, прикоснувшись нижним краем предметного стекла к промокательной бумаге, и насухо вытирают нижнюю сторону предметного стекла лабораторной салфеткой.
8. Предметные стекла высушивают на столике с подогревом при температуре от 45 до 50°C в течение 2-5 минут.

Гибридизация

1. 10 мкл смеси зондов наносят на целевую область предметного стекла. Незамедлительно поверх зонда помещают покровное стекло размером 22 x 22 мм и дают ему равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха будут мешать гибридизации, и их следует избегать. Оставшийся раствор зонда следует заморозить сразу после использования.
2. Покровное стекло запечатывают резиновым клеем следующим образом: набирают резиновый клей в шприц на 5 мл. Выдавливают небольшое количество резинового клея по периферии покровного стекла, перекрывая покровное стекло и предметное стекло, образуя уплотнение вокруг покровного стекла.
3. Предметные стекла помещают в предварительно нагретую увлажненную камеру для гибридизации. Камеру закрывают плотной крышкой и инкубируют при температуре 37°C в течение ночи (от 14 до 18 часов).
4. Переходят к промывкам после гибридизации.

Промывки после гибридизации

1. В сосуд Коплина добавляют буфер для промывки после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40). Предварительно нагревают буфер для промывки после гибридизации, поместив сосуд Коплина в водяную баню при температуре 72 ± 1°C не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 72 ± 1°C.
   ПРИМЕЧАНИЕ. Перед промывкой каждой партии температуру промывочного раствора следует доводить до 72 ± 1°C.
1. Буфер для промывки после гибридизации помещают во второй сосуд Коплина при комнатной температуре. Оба промывочных раствора выбрасывают через 1 день использования.
2. С первого предметного стекла удаляют уплотнитель из резинового клея, осторожно потянув герметик пинцетом.
3. Предметные стекла погружают в буфер для промывки после гибридизации при комнатной температуре и удаляют покровное стекло.
4. После удаления покровного стекла удаляют излишки жидкости по краю предметного стекла. Предметное стекло помещают в буфер для промывки после гибридизации при 72 ± 1°C на 2 минуты (6 предметных стекол на сосуд).
5. Каждое предметное стекло вынимают из промывочной ванны и высушивают на воздухе в темноте в вертикальном положении. (Достаточно закрытого ящика или полки внутри закрытого шкафа).
6. 10 мкл контрастного красителя DAPI наносят на целевую область предметного стекла и накрывают покровным стеклом. Перед подсчетом сигналов предметные стекла хранят в темноте.

Хранение предметных стекол

Гибридизированные предметные стекла (с покровными стеклами) хранят при температуре -20°C в темноте. После снятия с хранения при -20°C предметному стеклу дают нагреться до комнатной температуры перед просмотром под флуоресцентным микроскопом.

Подсчет сигналов

Оценка пригодности предметных стекол

Оценку пригодности предметных стекол проводят с использованием следующих критериев.

- Интенсивность сигнала зонда: сигналы должны быть яркими, четкими и легко поддающимися оценке. Сигналы должны быть яркими, компактными, овальными или волокнистыми, рассеянными, овальными.
- Фон: Фон должен быть темным или черным и относительно свободным от флуоресцентных частиц или туманности.

Если какие-либо из вышеперечисленных характеристик не отвечают требованиям, смотрите Руководство по устранению неполадок (рак молочной железы) в таблице 3 и используйте свежее предметное стекло.

Распознавание целевых сигналов

Используют рекомендованные фильтры. Регулируют глубину фокуса и изучают размер и форму целевых сигналов и шума (мусора). Подсчитывают сигналы гибридизации только среди опухолевых клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Опухолевые клетки в целом больше нормальных клеток, лимфоцитов и эпителиальных клеток. Определяют целевые области окрашиванием гематоксилином и эозином (H&E) на каждом 10-м стекле одного и того же тканевого блока. Эти области определяют на покровном стекле после проведения анализа методом FISH.

Выбор оптимальной области обзора и оцениваемых ядер

Используют объектив с 25-кратным увеличением, чтобы просмотреть гибридизированную область и найти интересующую целевую область (опухолевые клетки, идентифицированные окрашиванием H&E). Избегают участков некроза и нечетких границ ядер. Пропускают те ядра с сигналами, которые требуют субъективной оценки. Пропускают сигналы со слабой интенсивностью и неспецифичностью или с шумным фоном. Пропускают ядра с недостаточным контрастом для определения границы ядра. Перечисляют только ядра с дискретными сигналами.

Подсчет сигналов

Используя объектив с 40-кратным увеличением, сканируют несколько областей опухолевых клеток, чтобы учесть возможную гетерогенность. Выбирают зону хорошего ядерного распределения. Избегают целевых областей со слабыми сигналами гибридизации. Используя объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением, начинают анализ в верхнем левом квадранте выбранной области и, просматривая слева направо, подсчитывают количество сигналов в пределах границы ядра каждой оцениваемой интерфазной клетки в соответствии с указаниями, приведенными ниже и на рисунке 1.

- Сфокусируйтесь вверху и внизу, чтобы найти все сигналы, присутствующие в ядре.
- Считают 2 сигнала одинакового размера, которые находятся друг от друга на расстоянии не более диаметра сигнала, как один сигнал.
- Ядра без сигналов или с сигналами только одного цвета не оценивают. Оценивают только ядра с одним или более FISH-сигналами каждого цвета.
- Для каждого ядра подсчитывают количество сигналов LSI HER-2/neu и количество сигналов CEP 17.

  ПРИМЕЧАНИЕ: Для просмотра обоих цветовых сигналов может потребоваться переключение между наборами фильтров DAPI/9-оранжевый, DAPI/зеленый, зеленый/оранжевый (V.2) и DAPI/зеленый/оранжевый (V.2). Записывают количество (см. рекомендуемый метод определения отношения LSI hER-2/*neu* к CEP 17).

Рисунок 1. Руководство по учету двухцветных сигналов

Условные обозначения: = зеленый зонд, CEP 17; = оранжевый зонд, LSI HER-2/neu

1		Подсчитывают как 2 оранжевых и 2 зеленых в каждом ядре. Ядра перекрываются, все области обоих ядер не видны, а сигналы не находятся в области перекрытия.
2		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал рассеян.
3		Не считают. Ядра перекрываются, все области ядер не видны, а некоторые сигналы находятся в области перекрытия.
4		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал разделен.
5		Подсчитывают как 1 оранжевый сигнал и 2 зеленых сигнала. Один зеленый сигнал разделяется, и оранжевый сигнал разделяется.
6		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 1 зеленый сигнал.
7		Подсчитывают как 3 оранжевых сигнала и 1 зеленый сигнал.
8		Подсчитывают как 4 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала.

Рекомендуемый метод определения отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17

Рекомендуемый метод определения отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 состоит в том, чтобы разделить общее количество сигналов LSI HER‑2/*neu* на общее количество сигналов CEP 17 в 20 подсчитанных ядрах.

1. Определяют и записывают количество LSI HER-2/*neu* и CEP 17 в 20 ядрах (см. **таблицу 1** для примера).
2. Добавляют все сигналы LSI HER-2/*neu*. Эта сумма представляет собой общее количество сигналов LSI HER-2/*neu* (например, 252 в **таблице 1**).
3. Добавляют все сигналы CEP 17. Эта сумма представляет собой общее количество сигналов CEP 17 (например, 44 в **таблице 1**).
4. Для расчета окончательного результата используют следующее отношение:
   Суммарные сигналы LSI HER-2/*neu* (этап 2)/общие сигналы CEP 17 (этап 3) (например, 252/44 равняется отношению 5,73, что является положительным для амплификации HER-2/*neu*).
   Если отношение LSI hER-2/*neu* к CEP 17 является пограничным (от 1,8 до 2,2), подсчитывают еще 20 ядер и пересчитывают отношение, исходя из всего 40 ядер.
5. Результаты указывают следующим образом:
   Если отношение < 2, амплификации гена HER-2/*neu* не наблюдалось; если соотношение ≥ 2, амплификация гена HER-2/*neu* наблюдалась .
   ПРИМЕЧАНИЕ: отношение на границе порога или около него (от 1,8 до 2,2) следует интерпретировать с осторожностью, как описано выше.

Таблица 1. Примерный лист данных по раку молочной железы

Номер клетки	**LSI HER-2/*neu***	**CEP 17**
1	5	1
2	6	1
3	10	1
4	11	1
5	14	1
6	17	1
7	6	2
8	11	2
9	15	2
10	14	2
11	16	2
12	20	2
13	8	3
14	10	3
15	12	3
16	14	3
17	18	3
18	19	3
19	11	4
20	15	4
Всего	**252**	**44**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование контрольных предметных стекол

Контрольные предметные стекла необходимо анализировать одновременно с предметными стеклами пациента, чтобы контролировать выполнение анализа и оценивать точность подсчета сигналов. Контрольные предметные стекла следует использовать, начиная с процедуры подготовки предметных стекол (см. раздел «**ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ**»). Контроли следует анализировать каждый день тестирования методом FISH с использованием каждой новой партии набора PathVysion Kit II. Контрольные предметные стекла ProbeChek HER-2/*neu* требуются при каждой серии анализов обработанных предметных стекол пациента. Кроме того, отдельные пользователи могут использовать собственный контрольный материал при условии, что он охарактеризован и подтвержден в соответствии с требованиями ИХЛ высокой степени сложности.

Оценивают пригодность контрольных предметных стекол и выполняют подсчет сигналов в соответствии с инструкциями, представленными в разделе «Подсчет сигналов». Критерии пригодности предметных стекол должны быть удовлетворены, и результаты отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 должны находиться в пределах установленных диапазонов приемлемых характеристик теста. Для получения приемлемых результатов оценки контрольных предметных стекол ProbeChek HER-2/*neu* см. **таблицу 2**.

Ни в коем случае не следует указывать результаты флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), если контроли не дали результатов. Если контрольные предметные стекла не соответствуют критериям приемлемости, возможно, анализ не был проведен должным образом или компоненты набора PathVysion Kit II могли сработать ненадлежащим образом. Потребуется повторный анализ со свежими контрольными предметными стеклами и предметными стеклами пациентов. Если контрольные предметные стекла соответствуют критериям приемлемости, но результаты выходят за пределы указанного диапазона, подсчет мог быть выполнен неправильно, и может потребоваться повторный независимый анализ того же предметного стекла. В случае неудачной гибридизации при использовании либо образца, либо контрольного предметного стекла смотрите Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак молочной железы) в **таблице 3**. Для клинических образцов, когда интерпретация сигнала гибридизации затруднена, а образца для повторного анализа недостаточно, тест считается неинформативным. Если клеток для анализа недостаточно, тест считается неинформативным. Контроль образцов пациентов следует проводить в соответствии с требованиями стандартных лабораторных процедур. Качество гибридизации и результаты подсчета должны быть задокументированы в соответствующей форме. При оценке результатов следует учитывать качество и эффективность гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2. Приемлемые диапазоны отношения HER-2/*neu* к CEP 17 для контрольных предметных стекол ProbeChek HER-2/*neu*

Контроль	Допустимый диапазон HER-2/*neu* к CEP 17
Нормальное отношение Контрольное предметное стекло (Номер по каталогу 30-805093/Номер по списку 02J05-030) Пороговое (слабо усиленное) Отношение Контрольное предметное стекло (Номер по каталогу 30-805042/Номер по списку 02J04-030)	От 0,75 до 1,25 От 1,6 до 2,0

Таблица 2A. Приемлемые диапазоны отношения HER-2/*neu*к CEP 17 для (автоматизированного) подсчета контрольных предметных стекол ProbeChek HER-2/*neu* системой Abbott AutoVysion

Контроль	Допустимый диапазон HER-2/*neu* к CEP 17
Нормальное отношение Контрольное предметное стекло (Номер по каталогу 32-805093/Номер по списку 02J05-010) Пороговое (слабо усиленное) отношение Контрольное предметное стекло (Номер по каталогу 32-805042/Номер по списку 02J04-010)	От 0,7 до 1,7 От 1,5 до 2,6

Таблица 3. Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак молочной железы)

Проблема	Вероятная причина	Решение
• Сигнал отсутствует или слабые сигналы	• Неправильный набор фильтров для просмотра предметного стекла	• Используйте рекомендуемые фильтры.
	• Микроскоп не работает должным образом	• Обратитесь к техническому представителю производителя микроскопа.
	• Неправильные лампы (например, ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте ртутную лампу (рекомендуется 100 Вт) или другую лампу с аналогичной интенсивностью и спектральной мощностью.
	• Слишком старая ртутная лампа	• Замените на новую лампу.
	• Ртутная лампа сместилась	• Выровняйте лампу.
	• Грязные и/или потрескавшиеся линзы коллектора	• Очистите или замените линзу.
	• Грязное или разбитое зеркало в светильнике	• Очистите и замените зеркало.
	• Несоответствующие условия гибридизации	• Проверьте температуру инкубатора 37 ± 1°C. • Увеличьте время гибридизации как минимум до 14 часов.
	• Несоответствующая температура промывки после гибридизации	• Проверьте температуру раствора 72 ± 1°C.
	• Пузырьки воздуха задерживаются под покровным стеклом и препятствуют доступу зонда	• Нанесите покровное стекло, сначала прикоснувшись к поверхности смеси для гибридизации.
	• Недостаточное количество раствора для гибридизации среза	• Увеличьте количество раствора для гибридизации до 20 мкл на срез.
	• Недостаточное расщепление протеазой	• Проверьте температуру раствора 37 ± 1°C. • Убедитесь в том, что pH буфера составляет 2,0 ± 0,2. • Увеличьте время расщепления до 60 мин.
	• Срез слишком сильно зафиксирован (границы клеток будут четкими)	• Устраните фиксацию при предварительной обработке. • Оптимальное время фиксации при приготовлении предметных стекол, залитых парафином, составляет от 24 до 48 часов. Более длительное время фиксации приведет к постепенному снижению интенсивности сигнала.
	• Потеря ДНК (плохое окрашивание DAPI)	• Проверьте условия фиксации.
• Изменение интенсивности сигнала на срезе ткани	• Присуща многим срезам тканей	• Проверьте окрашивание DAPI. Если окрашивание DAPI на плохих участках хорошее, оцените предметное стекло. • Если окрашивание DAPI плохое на плохих участках, увеличьте время фиксации.
	• Зонд неравномерно распределен на предметном стекле из-за пузырьков воздуха под покровным стеклом	• • Повторите гибридизацию на следующем срезе или на том же предметном стекле и убедитесь в том, что под покровным стеклом нет пузырьков воздуха.
	• Слишком крупный срез	• • Увеличьте объем раствора для гибридизации до 20 мкл на больших срезах ткани.
• Шумный фон	• Неадекватная строгость промывки	• Проверьте pH в диапазоне от 7,0 до 7,5 буфера для промывки после гибридизации. • Проверьте температуру раствора 72 ± 1°C. • Во время промывки осторожно перемешивайте. • Увеличьте время промывки до 5 минут.
• Некроз ткани или ухудшение морфологии ткани	• Фиксированный срез ткани (плохое окрашивание DAPI)	• Проверьте время/условия фиксации.
	• Использовались неподходящие предметные стекла	• Используйте положительно заряженные предметные стекла.
	• Неправильный обжиг предметных стекол	• Проверьте температуру печи 56°C.
	• Чрезмерная предварительная обработка	• Проверьте температуру раствора для предварительной обработки 80 ± 1°C. • Уменьшите время предварительной обработки. • Уменьшите время расщепления протеазой.
	• Чрезмерная денатурация	• Проверьте температуру раствора для денатурации 72 ± 1°C. • Уменьшите время денатурации до 10 минут.
	• После гибридизации срез ткани был разорван с удалением покровного стекла	• Дайте покровному стеклу отмокнуть в буфере для промывки после гибридизации.

Обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular для получения дополнительной помощи.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количество сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 на ядро записывают в столбцах. Результаты подсчета 20 интерфазных ядер опухолевых клеток на мишень представлены в виде отношения общих сигналов HER-2/*neu* к сигналам CEP 17. Проведенное клиническое исследование показало, что образцы с амплификацией демонстрируют отношение сигналов LSI HER-2/*neu* к CEP 17 ≥ 2,0; нормальные образцы демонстрируют отношение < 2,0. Результаты, близкие к пороговой точке (1,8-2,2), следует интерпретировать с осторожностью. В случае пограничного результата (от 1,8 до 2,2), особенно если также наблюдается вариабельность подсчетов от ядра к ядру, следует провести подсчет еще 20 ядер. Другой специалист должен повторно подсчитать предметное стекло для проверки результатов. Если все еще есть сомнения, анализ следует повторить со свежим предметным стеклом. Если результаты теста не соответствуют клиническим данным, необходима консультация патолога и лечащего врача.

Причины повторения анализа

Ниже приведены ситуации, требующие проведения повторных анализов со свежими предметными стеклами и соответствующими контрольными предметными стеклами. Смотрите Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак молочной железы) в **таблице 3**, чтобы узнать о возможных причинах и действиях, необходимых для устранения конкретных проблем.

1. Если 1 или оба контрольных предметных стекла не соответствуют критериям приемлемости предметных стекол, результаты оценки предметных стекол ненадежны, и анализ необходимо повторить.
2. Если имеется менее 20 поддающихся оценке ядер, тест считается неинформативным, и анализ следует повторить.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Если после оценки качества предметных стекол, как описано в разделе «Подсчет сигналов», какой-либо из аспектов (интенсивность сигнала, фон или перекрестная гибридизация) не удовлетворяют требованиям, анализ необходимо повторить.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Набор для анализа на рак молочной железы PathVysion Kit II был оптимизирован только для идентификации и количественного определения хромосомы 17 и гена HER-2/*neu* в интерфазных ядрах из зафиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани молочной железы человека. Другие типы образцов или фиксаторов использовать не следует.
2. Эффективность набора PathVysion Kit II была подтверждена с использованием процедур, представленных только в этом листке-вкладыше. Модификации этих процедур могут повлиять на эффективность анализа.
3. Функциональные характеристики набора PathVysion Kit II были установлены только для пациентов с поражением лимфатических узлов, получающих назначенные схемы CAF, и для пациентов с метастатическим раком молочной железы, рассматриваемых для лечения препаратом HERCEPTIN. Эффективность при использовании других схем лечения не установлена.
4. Клиническая интерпретация любых результатов теста должна оцениваться в контексте истории болезни пациента и результатов других диагностических лабораторных тестов.
5. Результаты анализа методом FISH могут быть неинформативными, если качество образца и/или подготовка предметных стекол не соответствуют требованиям.
6. Технологи, выполняющие подсчет сигналов FISH, должны уметь визуально различать оранжевый и зеленый сигналы.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Интерфазный анализ методом FISH проводили на образцах ткани молочной железы человека, полученных от 524 пациентов с раком молочной железы, с целью проверки пороговой точки и оценки ожидаемого отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17. В каждом образце насчитывалось шестьдесят ядер. На основании пороговой точки 2,0 для оценки амплификации гена HER-2/*neu* в образцах ткани молочной железы (для получения подробной информации об определении пороговой точки см. раздел «Установление пороговой точки»), 433 образца были отрицательными, а 91 положительными на амплификацию гена HER-2/*neu*. Распределение отношений сигналов HER-2/*neu* к CEP 17 для 433 образцов без амплификации обобщено в **таблице 4.** Распределение отношений сигналов HER-2/*neu* к CEP 17 для 91 образца с амплифицированным геном HER-2/ *neu*, обобщено в **таблице 5**.

Таблица 4. Распределение отношения сигналов LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в образцах ткани молочной железы без амплификации

	Диапазон		
Статистика	От 0,1 до 1,0	От 1,1 до 1,5	От 1,6 до 1,99
Среднее значение	0,86	1,15	1,72
CO	0,14	0,13	0,11
n	185	226	22

Таблица 5. Распределение отношения сигналов LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в образцах ткани молочной железы с амплификацией

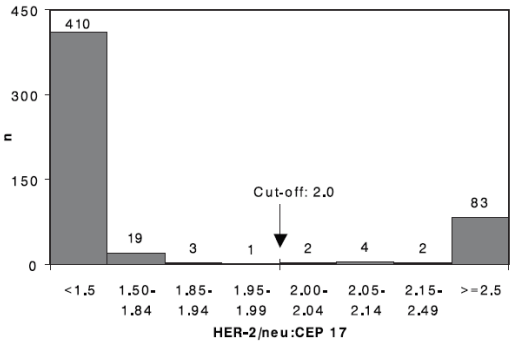
	Диапазон		
Статистика	От 2,0 до 5,0	От 5,1 до 10,0	> 10,0
Среднее значение	3,35	7,39	12,77
CO	0,95	1,41	1,80
n	33	42	16

CO = стандартное отклонение

Установление пороговой точки

В опорном исследовании CALGB 8869 пороговая точка для определения амплификации гена HER-2/*neu* составляла 2,0 на основе анализа наилучшего соответствия клинических результатов лечения CAF. Среди 433 образцов без амплификации наибольшее отношение сигналов LSI HER-2/*neu* к сигналам CEP 17 составляло 1,95, а среди 91 образца с амплификацией наименьшее отношение сигналов LSI HER-2/*neu* к сигналам CEP 17 составляло 2,0. Этот разрыв между наибольшим значением среди нормальных образцов и наименьшим значением среди образцов с амплификацией снижает вероятность ошибочной классификации при использовании 2,0 в качестве пороговой точки. Распределение отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в 524 образцах из исследования, описанного выше, показано на **рисунке 2**.

Рисунок 2. Распределение сигналов



ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Следующие функциональные характеристики были определены с использованием набора зондов PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (PathVysion Kit), номер по списку 02J01.

Аналитическая чувствительность и специфичность

Эффективность гибридизации

На контрольных предметных стеклах ProbeChek HER-2/*neu* средний процент клеток без сигнала гибридизации составлял от 0,0 до 2,0%. Эти предметные стекла приготовлены из зафиксированных формалином и залитых парафином клеточных линий рака молочной железы и представляют собой наиболее благоприятный вариант эффективности гибридизации. Таким образом, в этих условиях ожидается, что эффективность гибридизации составит 98%, при этом <2% клеток будут демонстрировать отсутствие сигнала для каждого зонда.

Аналитическая чувствительность

Аналитическую чувствительность зондов из набора PathVysion Kit проверяли в исследовании воспроизводимости, описанном ниже. В этом исследовании образец с отношением HER-2/*neu* к CEP 17 от 1,0 до 1,2 оценивали со средним значением 1,05 (± 0,03), а образец с отношением HER-2/*neu* к CEP 17 от 1,6 до 2,0 оценивали со средним значением 1,81 (± 0,08). Верхний 95% ДИ для образца с отношением от 1,0 до 1,2 составлял 1,11, а нижний 95% ДИ для образца от 1,6 до 2,0 составлял 1,65. Таким образом, предел обнаружения набора PathVysion Kit в интерфазных клетках, по оценкам, составляет 1,5.

Аналитическая специфичность

Исследования специфичности локуса проводили с использованием метафазных пластинок нормальных лимфоцитов в соответствии со стандартными протоколами ОКК компании Abbott Molecular. В общей сложности 254 метафазных пластинок последовательно исследовали методом G-бэндинга для идентификации хромосомы 17 и локуса гена HER-2/*neu*, с последующей флуоресцентной гибридизацией in situ (FISH). Никакой перекрестной гибридизации с другими локусами хромосом не наблюдалось ни в одной из 254 исследованных клеток. Гибридизация была ограничена намеченными целевыми областями двух зондов.

В соответствии со стандартными протоколами компании Abbott Molecular были также проведены исследования строгости на зафиксированных формалином и залитых парафином образцах ткани для определения оптимального времени и температуры денатурации, времени и температуры гибридизации, времени и температуры промывки после гибридизации, и состава буфера для промывки после гибридизации. Для стадии денатурации испытывали 3 температуры (65°C, 73°C и 80°C) по 2 минут, 5 минут и 8 минут каждая. Результаты не показали статистической разницы в общей оценке всех температур и продолжительности денатурации. Все комбинации прошли оценку качества. Проверка строгости стадии гибридизации состояла из 2 частей: сначала гибридизацию проводили при 5 различных температурах (27°C, 32°C, 37°C, 42°C и 47°C) в течение 18 часов, затем в течение 5 различных периодов времени (10, 14, 18, 22 и 26 часов) при рекомендованной температуре (37°C). На гибридизацию значительно влияли как температура, так и время гибридизации, при этом самые высокие общие показатели качества были получены при гибридизации при температуре 37°C в течение 18 часов, хотя статистически значимых различий в качестве гибридизации между 14 и 18 часами отмечено не было. Таким образом, рекомендуемое время инкубации составляет от 14 до 18 часов. Стадию промывки после гибридизации проверяли аналогичным образом. Первые анализы проводили при 5 различных температурах (69°C, 71°C, 73°C, 76°C, и 80°C), затем при различной продолжительности, в пределах от 2 до 8 минут при температуре 73°C. Существенным фактором была температура промывки, при этом самые высокие показатели были получены при температуре 73°C. Приемлемые результаты были получены при времени промывки от 2 до 5 минут, но увеличение времени промывки до 8 минут значительно снизило общий показатель качества некоторых образцов. Следовательно, рекомендуемые условия промывки после гибридизации составляют 72 ± 1°C в течение 2 минут. Также был проанализирован состав промывочного буфера для определения влияния на интенсивность сигнала и специфичность зонда. Увеличение концентрации соли с 0,4X SSC до 2X SSC увеличивало интенсивность сигнала, но, по всей видимости, не ухудшало специфичность зонда. Таким образом, рекомендуемым составом промывочного буфера является 2X SSC/0,3% NP-40.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Доклинические исследования воспроизводимости и повторяемости

Воспроизводимость анализа PathVysion для HER-2/*neu* определяли на последовательных срезах нормальной и амплифицированной ткани молочной железы, а также на срезах одной и той же ткани разной толщины. На 10 последовательных срезах ткани одной нормальной ткани молочной железы среднее отношение количества копий LSI HER-2/*neu* к CEP 17 составило 1,19 (CO = 0,05). Результаты представлены в таблице 6. На 10 последовательных срезах ткани из 1 образца с амплифицированным геном HER-2/*neu* среднее отношение количества копий HER-2/*neu* к CEP 17 составило 3,61 (CO = 0,50). Результаты представлены в таблице 7. Точно так же на 8 последовательных срезах нормальной ткани разной толщины (от 2 до 8 мкм) среднее отношение количества копий HER-2/*neu* к CEP 17 составило 1,15 (CO = 0,16). Эти результаты (показанные в таблице 8) свидетельствуют о приемлемой степени воспроизводимости анализа HER-2/*neu* методом FISH на срезах ткани толщиной от 4 до 8 мкм.

Таблица 6. Среднее количество сигналов на клетку и отношение количества копий LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в последовательных срезах (с нормальным HER-2/*neu*)

	Номер среза									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LSI HER-2	3,8	3,2	3,6	3,5	3,6	3,5	3,4	3,5	3,3	3,1
CEP 17	3,1	3,1	3,0	2,7	3,0	3,0	2,8	2,1	3,0	2,7
Отношение	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2	1,6	1,1	1,1

Таблица 7. Среднее количество сигналов на клетку и отношение количества копий LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в последовательных срезах (с амплифицированным геном HER-2/*neu*)

	Номер среза									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LSI HER-2	4,7	4,9	5,9	4,5	3,6	4,6	4,6	4,8	4,5	4,2
CEP 17	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,4	1,3
Отношение	3,9	3,7	4,7	3,6	2,8	3,7	3,3	3,8	3,3	3,3

Таблица 8. Среднее количество сигналов на клетку и отношение количества копий LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в последовательных срезах разной толщины

	Толщина среза (мкм)							
	2	2	4	4	6	6	8	8
LSI HER-2	2,3	2,4	2,4	2,7	2,7	2,8	2,6	3,3
CEP 17	1,7	1,8	2,3	2,5	2,7	2,7	2,5	3,2
Отношение	1,4	1,4	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,0

Воспроизводимость с использованием контрольных предметных стекол

Для оценки воспроизводимости анализа PathVysion, анализы отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 оценивали на воспроизводимость от участка к участку, воспроизводимость от партии к партии, ежедневную воспроизводимость и воспроизводимость от наблюдателя к наблюдателю на контрольных предметных стеклах с различными уровнями амплификация гена HER-2/*neu*. Четыре образца, состоящие из зафиксированной формалином и залитой парафином ткани, полученной из линий опухолевых клеток молочной железы человека, с нормальным (от 1,0 до 1,2) и амплифицированным (1,6 до 2,0, от 3 до 5, 7 до 11) отношениями LSI HER-2/*neu* к CEP 17, оценивали на LSI HER-2/*neu* и CEP 17 согласно инструкции по подсчету сигналов, представленной в листке-вкладыше. Общий показатель успешности гибридизации составил 98,3% (118/120) с первой попытки. Гибридизация 2 замененных предметных стекол прошла успешно. При использовании дисперсионного анализа наблюдались статистически значимые различия между наблюдателями, которые отражают субъективность в интерпретации и подсчете сигналов. Никаких статистически значимых изменений ни по одному из других параметров исследования не наблюдалось. Среднее значение, стандартное отклонение и процент КВ наблюдаемых отношений LSI HER-2/*neu* к CEP 17 показаны в **таблицах с** 9 по **12**.

Таблица 9. Воспроизводимость от участка к участку

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Статистика	Участок № 1	Участок № 2	Участок № 3
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,08	1,01	1,07
	CO	0,03	0,04	0,07
	КВ (%)	2,66	3,58	6,77
	n	8	8	8
От 1,6 до 2,0	Среднее значение	1,81	1,71	1,78
	CO	0,05	0,05	0,19
	КВ (%)	2,88	2,78	10,50
	n	8	8	8
От 3,0 до 5,0	Среднее значение	4,39	3,65	4,49
	CO	0,22	0,18	0,79
	КВ (%)	4,99	4,93	17,64
	n	8	8	8

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Таблица 10. Воспроизводимость от партии к партии

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Статистика	Партия № 1	Партия № 2	Партия № 3	Партия № 4
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,05	1,07	1,02	1,04
	CO	0,07	0,06	0,03	0,05
	КВ (%)	6,48	6,06	3,21	4,87
	n	6	6	6	6
От 1,6 до 2,0	Среднее значение	1,78	1,77	1,77	1,75
	CO	0,10	0,13	0,15	0,09
	КВ (%)	5,65	7,49	8,54	5,07
	n	6	6	6	6
От 3,0 до 5,0	Среднее значение	4,08	3,92	4,57	4,14
	CO	0,44	0,34	0,96	0,40
	КВ (%)	10,78	8,74	20,92	9,56
	n	6	6	6	6
От 7,0 до 11	Среднее значение	7,67	7,72	7,89	8,33
	CO	0,69	0,72	0,88	1,06
	КВ (%)	8,97	9,36	11,16	12,68
	n	6	6	6	6

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Таблица 11. Ежедневная воспроизводимость

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Статистика	День анализа № 1	День анализа № 2	День анализа № 3	День анализа № 4
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,06	1,07	1,02	1,04
	CO	0,06	0,07	0,05	0,04
	КВ (%)	5,65	6,61	4,58	4,03
	n	6	6	6	6
От 1,6 до 2,0	Среднее значение	1,76	1,77	1,77	1,77
	CO	0,17	0,14	0,08	0,10
	КВ (%)	9,62	7,99	4,31	5,65
	n	6	6	6	6
От 3,0 до 5,0	Среднее значение	4,24	4,48	4,10	3,89
	CO	0,48	0,97	0,36	0,38
	КВ (%)	11,25	21,56	8,89	9,71
	n	6	6	6	6
От 7,0 до 11	Среднее значение	7,91	8,01	7,72	7,97
	CO	1,11	0,90	0,57	0,89
	КВ (%)	13,99	11,22	7,39	11,20
	n	6	6	6	6

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 12. Воспроизводимость от наблюдателя к наблюдателю

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Статистика	Наблюдатель № 1	Наблюдатель № 2
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,06	1,04
	CO	0,07	0,03
	КВ (%)	7,00	2,85
	n	12	12
От 1,6 до 2,0	Среднее значение	1,71	1,82
	CO	0,10	0,11
	КВ (%)	6,01	6,20
	n	12	12
От 3,0 до 5,0	Среднее значение	4,05	4,31
	CO	0,44	0,73
	КВ (%)	10,80	16,84
	n	12	12
От 7,0 до 11	Среднее значение	7,52	8,28
	CO	0,49	0,95
	КВ (%)	6,55	11,44
	n	12	12

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Переносимость анализа

Для оценки переносимости анализа было проведено 5-центровое слепое рандомизированное сравнительное исследование с использованием зафиксированных формалином и залитых парафином образцов рака молочной железы человека.24 Исследуемые образцы состояли из зафиксированных формалином и залитых парафином срезов ткани рака молочной железы человека с различными уровнями амплификации гена HER-2/*neu*. Образцы включали 1 нормальный (без амплификации), 2 с низким уровнем и 1 с умеренным уровнем амплификации гена HER-2/*neu*, как было определено методом FISH.

Ежедневная воспроизводимость

В **таблице 13** представлены средние наблюдаемые отношения LSI HER-2/neu к CEP 17 за 3 дня анализа. Как видно из *P*-значения, статистически значимых изменений в значениях отношений за 3 дня исследования (все P-значения > 0,05) отмечено не было. Результаты этого исследования свидетельствуют о том, что анализ PathVysion воспроизводится изо дня в день.

Таблица 13. Сводная статистика по отношению LSI HER-2/*neu* к CEP 17 по дням анализа

Ожидаемое отношение	Статистика	День анализа № 1	День анализа № 2	День анализа № 3	*P*-значение
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,01	1,06	1,05	0,6826
	CO	0,10	0,12	0,08	
	КВ (%)	9,90	11,32	7,62	
	n	15	15	15	
От 2,1 до 2,8	Среднее значение	2,54	2,43	2,32	0,5535
	CO	0,19	0,32	0,22	
	КВ (%)	7,48	13,17	9,52	
	n	15	15	15	
ОТ 2,5 до 3,5	Среднее значение	3,18	2,98	3,03	0,2083
	CO	0,30	0,31	0,32	
	КВ (%)	9,43	10,40	10,56	
	n	15	15	15	
От 5,0 до 7,0	Среднее значение	5,69	5,63	5,69	0,9620
	CO	0,53	0,49	0,86	
	КВ (%)	9,31	8,70	15,11	
	n	15	15	15	

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Воспроизводимость от участка к участку

В **таблице 14** представлены средние наблюдаемые отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 для 5 исследовательских центров. Наблюдались некоторые статистически значимые различия в значении соотношения между 5 исследовательскими центрами (*P* = <0,05 для нормального образца и образца от 2,5 до 3,5). Однако эти различия не были клинически значимыми. 99% образцов были правильно классифицированы как положительные или отрицательные на амплификацию гена HER-2/neu. Сводка вариантов анализа по всем 5 представлена в таблице 15. Стандартное отклонение (CO) и коэффициент вариации (КВ) были относительно небольшими и стабильными для всех отношений LSI HER-2/*neu* к CEP 17.

Таблица 14. Воспроизводимость от участка к участку

Ожидаемое отношение	Статистика	Участок № 1	Участок № 2	Участок № 3	Участок № 3	Участок № 3	*P*-значение
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,00	1,16	1,01	1,04	0,97	0,0001
	CO	0,09	0,09	0,07	0,09	0,04	
	КВ (%)	9,00	7,76	6,93	8,65	4,12	
	n	9	9	9	9	9	
От 2,1 до 2,8	Среднее значение	2,40	2,46	2,57	2,26	2,65	0,0965
	CO	0,19	0,26	0,52	0,22	0,24	
	КВ (%)	7,92	10,60	20,20	9,73	9,06	
	n	9	9	9	9	9	
ОТ 2,5 до 3,5	Среднее значение	3,01	3,09	3,41	2,74	3,08	< 0,0001
	CO	0,21	0,35	0,20	0,23	0,16	
	КВ (%)	6,98	11,30	5,87	8,39	5,19	
	n	9	9	9	9	9	
От 5,0 до 7,0	Среднее значение	5,48	5,22	5,94	5,82	5,91	0,0568
	CO	0,66	0,43	0,56	0,89	0,18	
	КВ (%)	12,0	8,24	9,43	15,30	3,05	
	n	9	9	9	9	9	

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Сводка вариантов анализа по всем 5 представлена в **таблице 15**. Стандартное отклонение (CO) и коэффициент вариации (КВ) были относительно небольшими и стабильными для всех отношений LSI HER-2/*neu* к CEP 17.

Таблица 15. Резюме воспроизводимости от участка к участку

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Среднее значение	CO	КВ (%)	N
От 0,1 до 1,2	1,04	0,10	9,60	45
От 2,1 до 2,8	2,47	0,32	12,96	45
ОТ 2,5 до 3,5	3,07	0,31	10,10	45
От 5,0 до 7,0	5,67	0,63	11,11	45

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

В данном исследовании показатель эффективности гибридизации составил 100%, что подтверждает простоту использования набора PathVysion.

Клинические исследования

Доза циклофосфамида, адриамицина (доксорубицина) и 5-фторурацила (CAF), исследование CALGB 8869

Взаимодействие между амплификацией гена HER-2/*neu* и дозой CAF оценивали в ретроспективном анализе единичного рандомизированного клинического исследования CALGB 8869. Это было большое проспективное рандомизированное исследование у пациентов с раком молочной железы с поражением лимфатических узлов II стадии, в котором оценивали 3 различные дозы адъювантной химиотерапии CAF:

- Высокая доза (циклофосфамид 600 мг/м^2, доксорубицин 60 мг/м^2 и 5-фторурацил 600 мг/м^2 в течение 4 циклов),
- Умеренная доза (циклофосфамид 400 мг/м^2, доксорубицин 40 мг/м^2 и 5-фторурацил 400 мг/м^2 в течение 6 циклов), или
- Низкая доза (циклофосфамид 300 мг/м^2, доксорубицин 30 мг/м^2 и 5-фторурацил 300 мг/м^2 в течение 4 циклов).

Дозы вводили с 28-дневным циклом.

Помещенные в архив образцы тканей 572 пациентов, выбранных случайным образом из исходной исследуемой популяции, были включены в анализ методом FISH с использованием ДНК-зонда. Целями этого исследования являлись определение того, дает ли амплификация гена HER-2/*neu* статистически значимую и независимую прогностическую информацию, относящуюся к выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости у пациентов с раком молочной железы с поражением лимфатических узлов II стадии, получающих адъювантную терапию CAF, и изучение взаимосвязи между амплификацией гена HER-2/*neu* и клиническими данными, включая такие факторы, как степень злокачественности опухоли и стероид-рецепторный статус.

Среди этих 572 образцов опухолей 45 были исключены из-за неудачных результатов анализа методом FISH, а 3 были дублирующими. Осталось 524 случая для анализа. При использовании набора PathVysion, амплификация гена HER-2/*neu* составляла > 2 (т.е. отношение среднего сигнала HER-2/neu к среднему сигналу CEP 17 с 60 подсчитанными ядрами). В общей сложности 433 образца пациентов оказались HER-2/*neu*-отрицательными и 91 HER-2/*neu*-положительными.

В **таблице 16** перечислены несколько исходных характеристик 524 пациентов, у которых для оценки были взяты помещенные в архив образцы опухолей, а также представлены подробные данные адъювантного лечения, полученного в исходном исследовании CALGB 8869.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 16. Сравнение характеристик пациентов на исходном уровне и подробные данные адъювантного лечения

	С амплификацией HER-2/*neu** n = 91	Без амплификации HER-2/*neu** n = 433
Возраст		
< 40	17,6	14,5
40-50	39,6	40,0
> 50	42,9	48,5
Предклимактерический	46,2	39,5
Пери/постклимактерический	53,8	60,5
Размер опухоли		
< 2 см	31,9	37,2
От > 2 до < 5	57,1	58,4
> 5	9,9	3,9
неизвестно	1	0,5
Метастаз-позитивные узлы		
< 3	59,3	55,9
4-9	27,5	34,9
> 10	13,2	9,2
ER (+)	49,5	71,4
PR (+)	35,2	61,7
ER (+) или PR (+)	60,4	77,8
Режим дозирования CAF получен		
Высокий	33,0	34,4
Умеренный	34,1	31,4
Низкий	33,0	34,2

* Процент пациентов
ER = эстроген; PR = прогестерон

Результаты анализа выживаемости без признаков заболевания с моделью пропорциональных рисков Кокса и измерения амплификации гена HER-2/*neu* методом FISH показали статистически значимое взаимодействие между амплификацией гена HER-2/*neu* и режимом дозирования CAF (P = 0,033, критерий правдоподобия; см. **таблицу 17**). Аналогичным образом, результаты анализа общей выживаемости по модели пропорциональных рисков Кокса также свидетельствуют о статистически значимом взаимодействии между амплификацией гена HER-2/*neu* и полученным режимом дозирования CAF (P = 0,028, критерий правдоподобия; см. **таблицу 17**).

Таблица 17. Модель пропорциональных рисков Кокса, показывающая критерий отношения правдоподобия для выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости

Источник	Выживаемость без признаков заболевания			Общая выживаемость		
	DF	ChiSq	P-значение	DF	ChiSq	P-значение
CAF	2	5,56	0,06	2	4,57	0,10
Квадратный корень: кол-во метастаз-позитивных узлов	1	72,87	0,0000	1	56,32	0,0000
Опухоль > 2 см	1	13,77	0,0002	1	12,93	0,0003
Предклимактерический	1	1,96	0,16	1	0,10	0,76
Отношение HER-2	1	10,05	0,0015	1	10,52	0,0012
Зависимость отношения HER-2 от дозы CAF	2	6,84	0,033	2	7,15	0,028

DF = степени свободы; ChiSq = хи-квадрат

Вероятности выживаемости без признаков заболевания (**таблица 18, рис. 3a**) сопоставимы в трех группах пациентов с *HER-2/neu*-отрицательными опухолями. Например, через 7 лет после рандомизации оценочная вероятность выживания без признаков заболевания составляет 55%, 63% и 61% для групп с низкой (L), умеренной (M) и высокой (H) дозой CAF, соответственно. Эффект дозы больше у пациентов с HER-2/*neu*-положительными опухолями (**таблица 18, рисунок 3b**), при этом выживаемость без признаков заболевания в дозовых группах L, M и H CAF через 7 лет составила 36%, 44% и 66%, соответственно. Соответствующие показатели общей выживаемости через 7 лет (**таблица 19, рисунок 3c**) имеют аналогичное отношение: 64%, 75% и 70% у пациентов с HER-2/*neu*-отрицательными опухолями и 48%, 50% и 76% у пациентов с HER-2/*neu*-положительными опухолями, и снова для дозовых групп L, M и H CAF, соответственно (**таблица 19, рисунок 3d**).

Таблица 18. Вероятность выживаемости без признаков заболевания

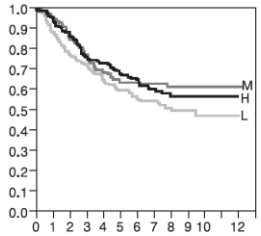
Доза CAF	HER-2/*neu*-отрицательный	HER-2/*neu*-положительный
Низкий	55%	36%
Умеренный	63%	44%
Высокий	61%	66%

Таблица 19. Вероятности общей выживаемости

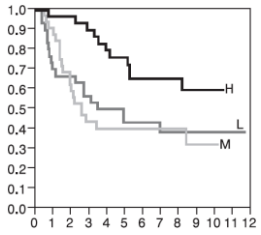
Доза CAF	HER-2/*neu*-отрицательный	HER-2/*neu*-положительный
Низкий	64%	48%
Умеренный	75%	50%
Высокий	70%	76%

Рисунок 3. Выживаемость без признаков заболевания (a, b) и общая (c, d) выживаемость пациентов с HER-2/*neu*-отрицательными (a, c) и положительными (b, d) опухолями в трех дозовых группах CAF H, M, и L*

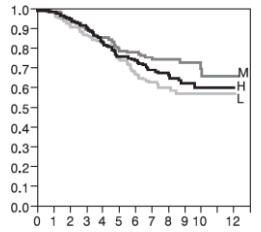
(a) Выживаемость без признаков заболевания при HER-2/*neu*-отрицательных опухолях



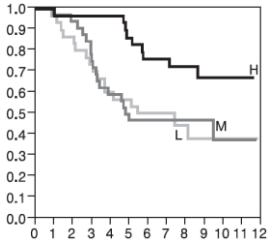
(b) Выживаемость без признаков заболевания при HER-2/*neu*-положительных опухолях



в) Общая выживаемость при HER-2/*neu*-отрицательных опухолях



(d) Общая выживаемость при HER-2/*neu*-положительных опухолях



*HER-2/neu-положительность означает HER/CEP ≥ 2. Размеры выборки при (a, c) составляют 149, 136 и 148 (для H, M и L), а при (b, d) - 30, 31 и 30.
Уровни значимости HER-2/neu по взаимодействию с CAF на основании моделей пропорциональных рисков (**таблица 17**) составляют 0,033 в случае выживаемости без признаков заболевания - (a) по сравнению с (b) - и 0,028 в случае общей выживаемости - (c) по сравнению с (d).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Анализ исследуемых образцов методом FISH показал, что у пациентов с амплификацией гена HER-2/*neu* наблюдался значительный дозозависимый эффект адъювантной химиотерапии с CAF, но не у пациентов без амплификации или с минимальной амплификацией гена HER-2/*neu*. Эта связь была обнаружена в отношении как выживаемости без признаков заболевания, так и общей выживаемости. Кроме того, в этом исследовании не было обнаружено корреляции между количеством копий HER-2/*neu*, оцененным методом FISH, и возрастом пациента, менопаузальным статусом, размером опухоли или количеством метастаз-позитивных узлов. Статистически значимая отрицательная корреляция наблюдалась между количеством копий HER-2/*neu* и статусом рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR).

Соответствие анализу в рамках клинических исследований (CTA)

Первичный механизм сверхэкспрессии белка HER-2/*neu* при раке молочной железы человека, по-видимому, связан с амплификацией гена.[25-28] Обнаружение амплификации гена HER-2/*neu* методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) является дополнительным диагностическим методом определения сверхэкспрессии HER-2/*neu*.

Набор PathVysion сравнивали с CTA, который использовался для включения пациентов в опорные исследования препарата HERCEPTIN, спонсируемые Genentech (H0648g, H0649g и H0650g).[26,27] Для установления соответствия между FISH и CTA, подмножество из 623 образцов (317 положительных и 306 отрицательных, как было определено в CTA) было случайным образом выбрано в предполагаемом соотношении 1:1 из образцов, отобранных для включения в исследования HERCEPTIN. Анализы методом FISH проводились на всех образцах. Содержательные результаты были получены на 529 образцах. Результаты анализа 529 информативных случаев представлены в **таблице 20**.

Таблица 20. CTA по сравнению с FISH

	Показатель CTA				
FISH	0	1+	2+	3+	**Всего**
Отрицательный	207 7	28	67	21	323
Положительный	(3,2%)	2 (6,7%)	21 (23,9%)	176 (89,3%)	206
всего	214	30	88	197	529

Результаты свидетельствуют о соответствии 2 x 2 82% (95% доверительный интервал от 79 до 85%), где соответствие было определено как доля образцов с показателем 0 или 1+ по CTA и неамплифицированных по FISH, плюс доля образцов с показателем 2+ или 3+ по CTA и амплифицированных по FISH. Эти данные согласуются с высокой степенью соответствия между сверхэкспрессией белка (как было определено в иммуногистохимическом анализе [CTA]) и амплификацией гена (как определено методом FISH [Набор PathVysion Kit]).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РАК ЖЕЛУДКА

Требуемые, но не предоставляемые материалы

Лабораторные реагенты

- Реагенты для предварительной обработки желудка (ручной анализ)
  - Протеаза IV, 75 мг (номер по списку 06N46-001)
- Реагенты для предварительной обработки желудка (автоматический анализ - VP 2000)
  - Протеаза IV, 750 мг (номер по списку 06N46-002)
  - Стандартный солевой раствор (20X SSC): 500 г (номер по списку 02J10-032)
- Осветляющий агент Hemo-De (или аналог, например, d-лимонен)
- Гематоксилин и эозин (H&E)
- Иммерсионное масло, подходящее для флуоресцентной микроскопии. Хранить при комнатной температуре (от 15 до 30°C).
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированный (12 н.) раствор хлористоводородной кислоты (HCl)
- 1 н. раствор HCl
- Натрия гидроксид (NaOH)
- Очищенная вода (дистиллированная, деионизированная или вода качества Milli-Q). Хранить при комнатной температуре.
- Каучуковый клей

ПРИМЕЧАНИЕ. Если условия хранения не указаны, храните реагенты в соответствии с рекомендациями поставщика.

Лабораторное оборудование

- Процессор VP 2000
- ThermoBrite (номер по списку 07J91-010 или 07J91-020)
- Карты влажности ThermoBrite (номер по списку 07J68-001)
- Предварительно очищенные силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Покровное стекло 22мм x 22мм
- Микролитровая пипетка (от 1 до 10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Магнитное перемешивающее устройство
- Вихревая мешалка
- Мерный цилиндр
- Водяные бани с циркуляцией (73°C и 80°C)

ПРИМЕЧАНИЕ. Статические водяные бани не обеспечивают адекватный контроль температуры для бани с более высокой температурой.

- Водяная баня с циркуляцией или без нее (37°C)
- Безбелковая водяная баня (40 ± 2°C)
- Воздушные инкубаторы/духовка/электроплитка (56 ± 2°C)
- Резец для стекла
- Пинцеты
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (от 50 до 70 мл); Предлагаемый тип: вертикальный сосуд для окрашивания
- Флуоресцентный микроскоп с рекомендованными фильтрами (см. следующий раздел)
- pH-метр
- Калиброванный термометр
- Коробка с предметными стеклами с крышкой
- Фильтрационная установка с порами размером 0,22 или 0,45 мкм

Микроскопическое оборудование и принадлежности

Микроскоп: Для просмотра результатов гибридизации необходим флуоресцентный микроскоп с осветителем отражённого света. Микроскоп должен быть проверен, чтобы убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальный осмотр образцов при анализе флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) Микроскоп, используемый для обнаружения общих следов ДНК, таких как DAPI, йодид пропидия и квинакрин, может работать неправильно для анализов флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Рекомендуется регулярная очистка микроскопа и периодическое техническое обслуживание, особенно выравнивание ртутной лампы, техническим представителем изготовителя.

ПРИМЕЧАНИЕ: часто предполагаемый отказ реагентов в анализе in situ может фактически указывать на то, что для просмотра успешно проведенного анализа на гибридизацию используется неисправный или неоптимальный флуоресцентный микроскоп или неправильный набор фильтров.

Источник света возбуждения: Рекомендуемым источником возбуждения является 100-ваттная ртутная лампа или другая лампа с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Регистрируют количество часов, в течение которых использовалась лампа, и заменяют ее до того, как номинальное время работы будет превышено. Убеждаются, что лампа правильно выровнена.

Объективы: Используйте масляные иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75 при использовании микроскопа со 100 - ваттной ртутной лампой или другой лампой с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Объектив с 25-кратным увеличением в сочетании с окулярами 10-кратного увеличения подходит для определения местоположения цели. Объектив с 40-кратным увеличением в сочетании с окулярами 10-кратного увеличения подходит для сканирования. Удовлетворительные результаты определения числа сигналов FISH могут быть получены с помощью масляного погружного ахроматического объектива с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: Иммерсионное масло, используемое с масляными иммерсионными объективами, должно быть предназначено по составу для низкой автофлуоресценции и специально для использования в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры: Наборы однополосных флуоресцентных фильтров для микроскопов, оптимизированные для использования с PathVysion Kit II, можно приобрести у компании Abbott Molecular для большинства моделей микроскопов. Рекомендуемые наборы фильтров для набора PathVysion Kit II: однополосный оранжевый, однополосный зеленый и однополосный DAPI. Гибридизация зондов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 с их целевыми областями отмечена оранжевой и зеленой флуоресценцией соответственно. Вся остальная ДНК будет флуоресцировать синим цветом с окрашиванием DAPI.

Использование этого фильтра Vysis	Позволяет добиться возбуждения и выделения...
Оранжевый однополосный	Флурофор SpectrumOrange
Зеленый однополосный	Флурофор SpectrumGreen
Однополосный DAPI	DAPI (4,6-Диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид)

Приготовление исходных реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ. В соответствующих случаях измеряют pH этих растворов при комнатной температуре. Если не указано иное, используют pH-метр со стеклянным электродом.

Стандартный солевой раствор (20X SSC) (250 мл для предварительной обработки в ручном анализе)

Для приготовления объединяют:

66 г	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
200 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Доводят до 250 мл водой очищенной. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,22 или 0,45 мкм. Хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Стандартный солевой раствор (20X SSC) (500 мл для автоматического анализа - предварительная обработка VP 2000)

Для приготовления объединяют:

132 г	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
400 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Доводят до 500 мл водой очищенной. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,22 или 0,45 мкм. Хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Раствор для предварительной обработки (1X SSC) (1 л)

Для приготовления объединяют:

50 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
900 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Измеряют pH и регулируют pH до 6,3 ± 0,2 с помощью NaOH или HCl. Добавляют воду очищенную, чтобы довести конечный объем до 1 литра. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,22 или 0,45 мкм. Хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Растворы этанола

Готовят разведения об/об 70%, 85% и 100% этанола, используя 100% этанол и очищенную воду. Когда не используют, хранят при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах.

Промывочный буфер после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40) (1 л)

Для приготовления объединяют:

100 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
850 мл	вода очищенная
3 мл	NP-40

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Регулируют pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH или HCl. Объем доводят до 1 литра водой очищенной. Фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 или 0,45 мкм. Неиспользованный раствор хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Протеазный буфер (0,1 н. раствор HCl) (1 л)

Для приготовления объединяют:

100 мл	1 н. раствор HCl
900 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Неиспользованный раствор хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Подготовка рабочих реагентов для ручной процедуры

ПРИМЕЧАНИЕ. Объемы растворов указаны для сосудов Коплина на 50-70 мл (см. «Лабораторное оборудование»). При использовании разных сосудов Коплина могут потребоваться большие объемы. Раствора должно быть достаточно, чтобы покрыть целевую область, но не настолько, чтобы полностью погрузить в него этикетки предметных стекол.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Осветляющий агент Hemo-De
3 сосуда Коплина заполняют 50-70 мл осветляющего агента Hemo-De. Выбрасывают после 1 недели использования.
Раствор для предварительной обработки
От 50 до 70 мл стандартного солевого раствора (1X SSC) с pH 6,3 помещают в сосуд Коплина. Перед предварительной обработкой предметных стекол сосуд комнатной температуры нагревают до 80 ± 1°C на водяной бане с циркуляцией. Перед использованием проверяют, чтобы температура раствора составляла 80 ± 1°C. Выбрасывают после 1 дня использования.
Раствор протеазы (1,5 мг/мл)
75 мг протеазы (номер по списку 06N46-001) добавляют к 50 мл 0,1 н. раствора HCl для получения конечной концентрации протеазы 1,5 мг/мл. Осторожно перемешивают. Раствор протеазы помещают в сосуд Коплина, а сосуд Коплина помещают в водяную баню при 37 ± 1°C. Выдерживают в течение не менее 30 минут, периодически перемешивая перед началом анализа, и перед использованием проверяют, чтобы температура буфера составляла 37 ± 1°C. Перед использованием визуально убеждаются в том, что протеаза полностью растворилась. Раствор выбрасывают через 1 день использования.
Вода очищенная
1 сосуд Коплина заполняют 50-70 мл воды очищенной. Используют при комнатной температуре.
Растворы этанола
Растворы можно использовать в течение 1 недели до тех пор, пока не будет отмечено испарение или раствор не станет слишком разбавленным из-за чрезмерного использования.
3 сосуда Коплина заполняют 50-70 мл 100% этанола.
1 сосуд заполняют 50-70 мл 85% этанола.
1 сосуд заполняют 50-70 мл 70% этанола.

Приготовление рабочих реагентов для процедуры VP 2000

Осветляющий агент Hemo-De
3 емкости VP 2000 (комнатной температуры) заполняют 500 мл осветляющего агента Hemo-De каждый. Выбрасывают после 1 недели использования.
Раствор для предварительной обработки
500 мл стандартного солевого раствора (1X SSC) с pH 6,3 помещают в емкость VP 2000 (нагретую). Перед предварительной обработкой предметных стекол раствор комнатной температуры нагревают до 80°C. Перед использованием проверяют, чтобы температура раствора составляла 80°C. Выбрасывают после 1 дня использования.
Раствор протеазы (1,5 мг/мл)
750 мг протеазы (номер по списку 06N46-002) добавляют к 500 мл 0,1 н. раствора HCl в емкости VP 2000 до достижения конечной концентрации 1,5 мг/мл. Осторожно перемешивают и нагревают до 37 ± 1°C. Выдерживают в течение не менее 30 минут, периодически перемешивая перед началом анализа, и перед использованием проверяют, чтобы температура буфера составляла 37 ± 1°C. Перед использованием визуально убеждаются в том, что протеаза полностью растворилась. Раствор выбрасывают через 1 день использования.
Вода очищенная
VP 2000 должен быть подключен к источнику воды очищенной для подпитки проточной промывной емкости.
Растворы этанола
Растворы можно использовать в течение 1 недели до тех пор, пока не будет отмечено испарение или раствор не станет слишком разбавленным из-за чрезмерного использования.
3 емкости VP 2000 (комнатной температуры) заполняют 500 мл 100% этанола каждую. 1 емкость VP 2000 (комнатной температуры) заполняют 500 мл 85% этанола.
1 емкость VP 2000 (комнатной температуры) заполняют 500 мл 70% этанола.

ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

Отбор и обработка образцов

Набор PathVysion Kit II предназначен для использования с залитыми парафином образцами ткани рака желудка, зафиксированными формалином (10% забуференный нейтральный формалин). Сбор тканей должен выполняться в соответствии со стандартными лабораторными процедурами. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или очень высоких температур. Такие условия, как известно, повреждают ДНК и могут привести к сбою анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).
Ткань желудка следует готовить в виде срезов толщиной от 4 до 6 мкм. Зафиксированную формалином и залитую парафином ткань можно использовать и хранить в соответствии со стандартными лабораторными процедурами. Для обеспечения оптимальных результатов при использовании набора PathVysion Kit II, эти методы должны быть согласованы по всем анализируемым образцам.
Срезы тканей следует размещать на положительно заряженной стороне предметного стекла с органосилановым покрытием, чтобы минимизировать отделение ткани от предметного стекла во время проведения анализа методом FISH. Набор PathVysion Kit II содержит реагенты, достаточные примерно для проведения 20, 50 или 100 тестов. Один тест для набора PathVysion Kit II определяется как площадь 22 мм x 22 мм. Для больших срезов образцов потребуется более 10 мкл зонда на тест.

Приготовление предметного стекла из зафиксированной формалином и
залитой парафином ткани

1. С помощью микротома вырезают парафиновые срезы толщиной 5 ± 1 мкм.
2. Срезы помещают на безбелковую водяную баню при температуре 40 ± 2°C.
3. Срез устанавливают на положительно заряженное предметное стекло.
4. Предметные стекла высушивают на воздухе в течение ночи.
5. Выполняют стандартное окрашивание H&E 1 предметного стекла.
   ПРИМЕЧАНИЕ: предметное стекло, используемое для процедуры анализа, должно находиться в пределах 10 серийных секций h&E предметного стекла.

   ПРИМЕЧАНИЕ: Шаг 6 должен выполнять патолог.
6. Изучают и отмечают (обводят) максимально возможную область опухоли, исключая некротическую, воспалительную или нормальную слизистую.
7. С помощью резцы для стекла переносят метку с предметного стекла H & E на соответствующие участки неокрашенного предметного стекла, пометив стекло на стороне, противоположной срезу ткани.
8. Неокрашенные предметные стекла высушивают в течение 2 -24 часов при температуре 56 ± 2°C.
9. Неокрашенные предметные стекла обрабатывают, следуя приведенным ниже процедурам.

Подготовка предметных стекол

Ручная предварительная обработка

Депарафинирование предметных стекол
1. Предметные стекла погружают в осветляющий агент Hemo-De на 5 минут при комнатной температуре.
2. Повторяют шаг 1, используя свежий Hemo-De.
3. Повторяют шаг 1 еще раз, используя свежий Hemo-De.
4. Предметные стекла обезвоживают в 100% этаноле в течение 1 минуты при комнатной температуре.
5. Повторяют шаг 4. Немедленно приступают к предварительной обработке предметного стекла.

Предварительная обработка стекол
6. Предметные стекла помещают в раствор для предварительной обработки (1X SSC; pH 6,3) при 80 ± 1°C на 35 ± 5 минут. При необходимости, 2 предметных стекла можно поместить вплотную друг к другу в каждый слот в сосуде Коплина, по 1 предметному стеклу в каждый крайний слот. Для торцевых предметных стекол сторона предметного стекла с тканевым срезом должна быть обращена к центру сосуда.
7. Предметные стекла погружают в воду очищенную на 3 минуты при комнатной температуре. Предметные стекла удаляют из сосуда с водой очищенной. Лишнюю воду удаляют, промокнув края предметных стекол бумажным полотенцем. Не оставляют сохнуть.

Обработка протеазой
8. Предметные стекла погружают в раствор протеазы (протеаза IV, [номер по списку 06N46-001] 1,5 мг/мл в 0,1 н. растворе HCl) при температуре 37 ± 1°C на 20 ± 3 минут. При необходимости, 2 предметных стекла можно поместить вплотную друг к другу в каждый слот в сосуде Коплина, по 1 предметному стеклу в каждый крайний слот. Для торцевых предметных стекол сторона предметного стекла с тканевым срезом должна быть обращена к центру сосуда.
9. Предметные стекла погружают в воду очищенную на 3 минуты при комнатной температуре.
10. Предметные стекла погружают в 70% этанол на 1 минуту.
11. Предметные стекла погружают в 85% этанол на 1 минуту.
12. Предметные стекла погружают в 100% этанол на 1 минуту.
13. Предметные стекла высушивают на воздухе или на столике с подогревом.
    Приступают к процедуре совместной денатурации/гибридизации ДНК образца.

Автоматическая (VP 2000) предварительная обработка

Дополнительную информацию об использовании прибора см. в Руководстве по эксплуатации процессора Abbott VP 2000. Протокол предварительной обработки VP 2000 представлен в **таблице 21**.

ПРИМЕЧАНИЕ. Используют протеазу IV (номер по списку 06N46-002), 1,5 мг/мл в 0,1 н. раствор HCl.

Таблица 21. Протокол предварительной обработки VP 2000

Шаг	Решение	Температура	Время
1	Hemo-De	Комнатная	5 минут
2	Hemo-De	Комнатная	5 минут
3	Hemo-De	Комнатная	5 минут
4	100% этанол	Комнатная	1 минута
5	100% этанол	Комнатная	1 минута
6	Раствор для предварительной обработки 1X SSC	80°C	35 ± 5 мин
7	Вода очищенная, настройка непрерывного потока	Комнатная	3 минуты
8	Раствора протеазы	37°C	20 ± 3 мин
9	Вода очищенная, настройка непрерывного потока	Комнатная	3 минуты
10	70% этанол	Комнатная	1 минута
11	85% этанол	Комнатная	1 минута
12	100% этанол	Комнатная	1 минута
13	Сушка воздухом		

Приступают к процедуре совместной денатурации/гибридизации ДНК образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕТОДИКА АНАЛИЗА
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Подготовка зонда

1. Дают зонду нагреться до комнатной температуры, чтобы вязкость достаточно снизилась для обеспечения точного дозирования.
2. Перемешивают на вортексе. Каждую пробирку центрифугируют в течение 2-3 секунд в настольной микроцентрифуге, чтобы опустить содержимое на дно пробирки. Осторожно перемешивают на вортексе.

Совместная денатурация/гибридизация ДНК образцов

См. Руководство пользователя ThermoBrite для получения дополнительной информации о том, как использовать прибор.

1. Карту влажности смачивают водой и вставляют в слоты для карт ThermoBrite.
2. Устанавливают температуру плавления (Melt Temp) на 73°C и время плавления на 5 минут. Устанавливают температуру гибридизации (Hyb Temp) на 37°C, а время гибридизации (Hyb Time) на 12-24 часа.
3. Наносят 10 мкл смеси зондов на предметное стекло и сразу же накрывают покровным стеклом.
4. Запечатывают края покровного стекла резиновым клеем.
5. Запускают программу совместной денатурации/гибридизации.

По окончании периода гибридизации (от 12 часов до 24 часов) переходят к промывкам после гибридизации.

Промывки после гибридизации

1. В сосуд Коплина добавляют буфер для промывки после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40). Предварительно нагревают буфер для промывки после гибридизации, поместив сосуд Коплина в водяную баню при температуре 73 ± 1°C не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 73 ± 1°C.
   ПРИМЕЧАНИЕ: Температуру промывочного раствора измеряют, поместив датчик температуры в сосуд Коплина. Перед промывкой каждой партии температура промывочного раствора должна составлять 73 ± 1°C.
2. Буфер для промывки после гибридизации помещают во второй сосуд Коплина при комнатной температуре. Оба промывочных раствора выбрасывают через 1 день использования.
3. С предметных стекол удаляют уплотнитель из резинового клея, осторожно потянув герметик пинцетом.
4. Предметные стекла погружают в буфер для промывки после гибридизации при комнатной температуре и удаляют покровное стекло.
5. После того, как покровное стекло было удалено, удаляют излишки жидкости и погружают предметное стекло в промывочный буфер после гибридизации при температуре 73 ± 1°C на 2 минуты (4 предметных стекла на сосуд).
   ПРИМЕЧАНИЕ: Рекомендуется обрабатывать 4 предметных стекла на один сосуд Коплина для поддержания соответствующей температуры растворов. если у вас меньше 4 предметных стекол, добавляют пустые предметные стекла комнатной температуры, чтобы общее количество слайдов достигло 4.
6. Каждое предметное стекло вынимают из промывочной ванны и высушивают на воздухе в темноте в вертикальном положении. Достаточно закрытого ящика или полки внутри закрытого шкафа.
7. 10 мкл контрастного красителя DAPI наносят на целевую область предметного стекла и накрывают покровным стеклом. Перед подсчетом сигналов предметные стекла хранят в темноте.

Хранение предметных стекол

Гибридизированные предметные стекла (с покровными стеклами) хранят при температуре -20°C в темноте. После снятия с хранения при -20°C предметному стеклу дают нагреться до комнатной температуры перед подсчетом сигналов.

Подсчет сигналов

Оценка пригодности предметных стекол

Оценку пригодности предметных стекол проводят с использованием следующих критериев.

- Морфология ядра: выбранные области изучают с помощью объектива с 40-кратным или 63-кратным увеличением, наблюдая морфологию ядра в размеченной целевой области. Для оценки выбирают хорошо расщепленные участки ткани. Ядра, наблюдаемые по красителю DAPI, должны быть различимы и иметь четко определенные границы.
- Интенсивность сигнала зонда: сигналы должны быть яркими, четкими и легко поддающимися оценке. Сигналы должны быть компактными, овальными или волокнистыми (рассеянными) овальными.
- Фон: Фон должен быть темным (черным) и относительно свободным от флуоресцентных частиц.

Если размеченная целевая область на предметном стекле не соответствует этим критериям, анализ повторяют с новым предметным стеклом. Условия анализа могут быть изменены в пределах диапазонов, указанных в разделах **«Отбор и обработка образцов», «Предварительная обработка предметных стекол»**, «Совместная денатурация/гибридизация ДНК образца» и «Промывки после гибридизации».

Выбор оптимальной области обзора и оцениваемых ядер

- Используют объектив с 10- или 25-кратным увеличением и и однополосный фильтр DAPI, чтобы просмотреть гибридизированную область и найти интересующую целевую область (опухолевые клетки, идентифицированные окрашиванием H&E).
- Предметное стекло H&E, используемое в качестве ориентира для разметки, можно использовать для справки при выборе оптимальной области просмотра.
- Избегают участков некроза и нечетких границ ядер.

Распознавание целевых сигналов

Определение паттерна амплификации HER-2/*neu*: паттерны амплификации HER-2/*neu*, как правило, состоят из кластеров сигналов (см. **рисунок 4**, строка 8), но могут также состоять из отдельных сигналов HER-2/*neu* с большим количеством копий по сравнению с количеством копий CEP 17 (см. **рисунок 4**, строка 9).

- Размеченную целевую область сканируют, используя рекомендованные фильтры и объектив с 40-кратным или 63-кратным увеличением. Предметное стекло H&E, используемое в качестве ориентира для разметки, можно использовать для справки при оценке распределения сигнала.
- Регулируют глубину фокуса и изучают размер и форму целевых сигналов и шума (мусора).
- Избегают ядер, которые не соответствуют критериям пригодности, описанным в разделе «Оценка пригодности предметных стекол».
- Оценивают распределение сигнала только в опухолевых клетках, используя оранжевые и зеленые однополосные фильтры. Опухолевые клетки в целом больше нормальных клеток, лимфоцитов и эпителиальных клеток.
- Наблюдайте за общим распределением сигнала, которое может быть однородным или неоднородным. В случае неоднородного распределения для подсчета выбирают области, содержащие паттерны амплификации.

Подсчет сигналов

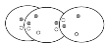
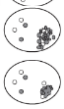
- Для подсчета выбирают примерно 4 неперекрывающихся поля обзора.
  - Однородное распределение сигнала:
    Для подсчета выбирают приблизительно 4 поля обзора, содержащие опухолевые клетки в пределах отмеченной целевой области.
  - Неоднородное распределение сигнала:
    Если существуют паттерны фокальной амплификации, для подсчета выбирают примерно 4 поля обзора, содержащие амплифицированные клетки. Если амплифицированные клетки перемешаны с полисомальными или дисомальными клетками, для подсчета выбирают приблизительно 4 поля обзора, содержащие паттерны амплификации, но включающие как амплифицированные клетки, так и последовательные неамплифицированные клетки при подсчете 20 клеток.
- Используя объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением и однополосный фильтр DAPI, начинают анализ в верхнем левом квадранте выбранной области. В каждом поле обзора для подсчета выбирают приблизительно 5 последовательных ядер с неповрежденными, четко определенными ядрами и четкими границами ядер. Затем переходят к следующему репрезентативному полю микроскопа и повторяют, пока не будет подсчитано в общей сложности 20 ядер. Переключаются на оранжевый и зеленый однополосные фильтры, чтобы подсчитать количество сигналов в пределах границы каждого выбранного ядра в соответствии с инструкциями, приведенными ниже и на **рисунке 4**.
- Сфокусируйтесь вверху и внизу, чтобы найти все сигналы, присутствующие в ядре.
- Считают 2 сигнала одинакового размера, которые находятся друг от друга на расстоянии не более диаметра 1 сигнала, как один сигнал (См. **рисунок 4**, ряд 4).
- Кластеры сигналов - это локализованные совокупности сигналов, содержащие минимум 3 соседних сигнала, находящихся друг от друга на расстоянии, которое меньше одного диаметра сигнала.
- Подсчет отдельных сигналов может быть затруднен из-за их близости друг к другу. В этом случае выполняют оценку количества копий сигнала (см. **рисунок 4**, строка 8).
  - Оценивают размер одиночного сигнала, а затем экстраполируют его на область, содержащую кластер сигналов. Оценивают размер области с шагом от 5 до 10 согласно рекомендациям, представленным в **таблице 22**.
  - Если ядро содержит отдельные сигналы LSI HER-2/*neu* вне кластера сигнала, их включают в оценку сигнала.
- Ядра без сигналов или с сигналами только одного цвета не оценивают. Оценивают только ядра с одним или более FISH-сигналами каждого цвета.
- Для каждого ядра подсчитывают количество сигналов LSI HER-2/*neu* и количество сигналов CEP 17. Записывают количество для каждого ядра (см. **таблицу 23**).
- Когда отдельные сигналы легко различимы, записывают фактическое количество в соответствии с **таблицей 22**. При наличии кластеров сигналов, фиксируют оценку номера сигнала с шагом 5 и записывают значения средней точки (см. рекомендации в таблице 22). Эти средние значения следует использовать для расчета отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 (как показано в **таблице 23**).

Таблица 22. Рекомендации по оценке количества сигналов для кластеров сигналов

Если оценка сигнала попадает в этот диапазон.	**... Затем фиксируют эти значения**
До 10	Записывают оценочное индивидуальное целочисленное значение
От 10 до 15	12,5
От 15 до 20	17,5
От 20 до 25	22,5
От 25 до 30	27,5
От 30 до 35	32,5
От 35 до 40	37,5
От 40 до 45	42,5
От 45 до 50	47,5
Более 50	50

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 4. Руководство по учету двухцветных сигналов

Условные обозначения:		= зеленый зонд, CEP 17 = оранжевый зонд, LSI HER-2/neu
1		Подсчитывают как 2 оранжевых и 2 зеленых сигнала в каждом ядре. Ядра перекрываются, все области обоих ядер не видны, а сигналы не находятся в области перекрытия.
2		Не считают. Ядра перекрываются, все области ядер не видны, а некоторые сигналы находятся в области перекрытия.
3		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала. Один зеленый сигнал рассеян.
4		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала. Один зеленый сигнал разделяется, и 1 оранжевый сигнал разделяется.
5		Подсчитывают как 1 оранжевый сигнал и 2 зеленых сигнала.
6		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала.
7		Подсчитывают как 4 оранжевых сигнала и 4 зеленых сигнала.
8		Сигналы в этих ядрах характерны для паттерна амплификации гена HER-2/*neu*. Оценивают количество оранжевых сигналов (LSI HER-2/*neu*) в кластере и добавляют к отдельным оранжевым сигналам, чтобы получить общее количество оранжевых сигналов. Оценка количества сигналов LSI HER-2/*neu* в этих примерах составляет от 25 до 30, а количество сигналов CEP 17 - 4. Более подробное объяснение представлено в **таблице 22**.
9		Сигналы в этом ядре характерны для паттерна амплификации гена HER-2/*neu*. Подсчитывают как 5 оранжевых (LSI HER-2/*neu*) сигналов и 2 зеленых (CEP 17) сигнала.

Рекомендуемый метод определения отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17

Рекомендуемый метод определения отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 состоит в том, чтобы разделить общее количество сигналов LSI HER‑2/*neu* на общее количество сигналов CEP 17 при подсчете 20 ядер.

1. Количества сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 на ядро записано в столбцах (см. **таблицу 23** для примера).

Таблица 23. Примерный лист данных по раку желудка

Номер клетки	**LSI HER-2/*neu***	**CEP 17**
1	5	1
2	6	1
3	10	1
4	12,5	1
5	12,5	1
6	17,5	1
7	6	2
8	12,5	2
9	12,5	2
10	12,5	2
11	17,5	2
12	17,5	2
13	8	3
14	10	3
15	12,5	3
16	12,5	3
17	17,5	3
18	17,5	3
19	12,5	4
20	17,5	4
Всего	**250**	**44**

2. Добавляют все сигналы LSI HER-2/*neu* (20 клеток). Эта сумма представляет собой общее количество сигналов LSI HER-2/*neu* (например, 250 в таблице 23).
3. Добавляют все сигналы CEP 17 (20 клеток). Эта сумма представляет собой общее количество сигналов CEP 17 (например, 44 в таблице 23).
4. Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17 рассчитывают путем деления суммы сигналов LSI HER-2/*neu* на сумму сигналов CEP 17 (например, 250/44 равняется соотношению 5,68, что говорит о присутствии амплификации HER-2/*neu*).
5. Если соотношение >2,2 или <1,8, то дальнейший подсчет НЕ требуется. Окончательный статус амплификации HER-2/*neu* будет основан на этом результате. Для получения окончательного результата переходят к шагу 7.
6. Если соотношение находится в пороговой точке или около нее (от 1,8 до 2,2), подсчитывают еще 20 ядер и пересчитывают отношение на основе комбинированных сумм сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 (40 клеток).
7. Когда будет получен окончательный результат:
   Если отношение <2,0, амплификации гена HER-2/*neu* не наблюдалось.
   Если отношение >2,0, амплификация гена HER-2/*neu* наблюдалась.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Оценивают пригодность предметного стекла в соответствии с инструкциями в разделе «Подсчет сигналов». Критерии пригодности предметных стекол должны быть удовлетворены. При оценке результатов следует учитывать качество и эффективность гибридизации.

Нормальные клетки обеспечивают внутренний контроль качества набора.

- Нормальные клетки содержат от 1 до 2 оранжевых (LSI HER-2/*neu*) и от 1 до 2 зеленых (CEP 17) сигналов.
- Обратите внимание, что некоторые нормальные клетки имеют менее 2 сигналов каждого цвета на клетку из-за усечения во время процедуры изготовления срезов.
- Нормальные области предметного стекла должны соответствовать критериям пригодности предметных стекол.

Тест считается неинформативным, если интерпретация сигнала гибридизации затруднена или если клеток для анализа недостаточно. В случае неудачной гибридизации смотрите Руководству по поиску и устранению неисправностей (рак желудка) в **таблице 24**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 24. Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак желудка)

Проблема	Вероятная причина	Решение
• Сигнал отсутствует или слабый сигнал	• Неправильный набор фильтров для просмотра предметного стекла	• Используйте рекомендуемые фильтры.
	• Микроскоп не работает должным образом	• Обратитесь к техническому представителю производителя микроскопа.
	• Неправильные лампы (например, ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте ртутную лампу (рекомендуется 100 Вт) или другую лампу с аналогичной интенсивностью и спектральной мощностью.
	• Слишком старая ртутная лампа	• Замените на новую лампу.
	• Ртутная лампа сместилась	• Выровняйте лампу.
	• Грязные или потрескавшиеся линзы коллектора	• Очистите или замените линзу.
	• Грязное или разбитое зеркало в светильнике	• Очистите и замените зеркало.
	• Несоответствующие условия гибридизации.	• Увеличьте время гибридизации в допустимом диапазоне.
	• Несоответствующая температура промывки после гибридизации	• Проверьте температуру буфера для промывки после гибридизации.
		• Уменьшите температуру буфера для промывки после гибридизации до нижнего предела допустимого диапазона температур.
	• Пузырьки воздуха задерживаются под покровным стеклом и препятствуют доступу зонда	• Нанесите покровное стекло, сначала прикоснувшись к поверхности смеси для гибридизации.
	• Недостаточное количество раствора для гибридизации среза	• Увеличьте количество раствора для гибридизации до 20 мкл на срез.
	• Недостаточное расщепление протеазой	• Проверьте температуру раствора протеазы.
		• Убедитесь в том, что используемая протеаза - это протеаза IV (номер по списку 06N46-001 или 06N46-002).
		• Убедитесь в том, что концентрация HCl составляет 0,1 н. HCl.
		• Убедитесь в том, что концентрация протеазы составляет 1,5 мг/мл в 0,1 н. раствор HCl.
		• Увеличьте время расщепления протеазы в допустимом диапазоне.
• Сигнал отсутствует или слабый сигнал (продолжение)	• Неадекватная предварительная обработка	• Проверьте температуру раствора для предварительной обработки. Проверяют, чтобы раствором для предварительной обработки был 1X SSC, pH 6,3 ± 0,2.
		• Увеличьте время инкубации раствора для предварительной обработки и/или температуру в пределах допустимого диапазона.
	• Срез слишком сильно зафиксирован (границы клеток будут четкими)	• Длительное время фиксации ткани перед замачиванием в парафин может привести к прогрессирующему снижению интенсивности сигнала и может потребовать увеличения времени расщепления протеазой или времени/температуры инкубации перед обработкой. Увеличьте время расщепления протеазой или время инкубации раствора для предварительной обработки и/или температуру в пределах допустимого диапазона.
• Изменение интенсивности сигнала на срезе ткани	• Присуща многим срезам тканей	• Проверьте окрашивание DAPI и интенсивность сигнала в целевой области. Если большая часть целевой области имеет неповрежденные ядра и яркие сигналы, тогда оцените предметное стекло.
	• Зонд неравномерно распределен на предметном стекле из-за пузырьков воздуха под покровным стеклом	• Повторите гибридизацию на следующем смежном срезе того же тканевого блока и убедитесь в том, что под покровным стеклом нет пузырьков воздуха.
		• Нанесите покровное стекло, сначала прикоснувшись к поверхности смеси для гибридизации.
	• Слишком крупный срез	• Увеличьте объем смеси зондов для гибридизации до 20 мкл на больших срезах ткани.
• Шумный фон	• Неадекватная строгость промывки	• Убедитесь в том, что pH раствора для промывки после гибридизации составляет от 7,0 до 7,5.
		• Проверьте температуру буфера для промывки после гибридизации.
		• Увеличьте температуру буфера для промывки после гибридизации до верхнего предела допустимого диапазона температур.
• Некроз ткани или ухудшение морфологии ткани	• Использовались неподходящие предметные стекла	• Используйте положительно заряженные предметные стекла.
•	• Неправильный обжиг предметных стекол	• Проверьте температуру и время термической обработки.
		• Если парафин на предметных стеклах не плавится, увеличьте температуру и/или время в допустимом диапазоне.
	• Чрезмерная предварительная обработка	• Проверьте температуру раствора для предварительной обработки.
		• Уменьшите время и/или температуру в допустимом диапазоне.
	• Чрезмерное расщепление	• Уменьшите время расщепления протеазы в допустимом диапазоне.
	• Чрезмерная денатурация	• Проверьте время и температуру денатурации ThermoBrite.
	• Срез ткани был разорван при удалении покровного стекла после гибридизации.	• Дайте покровному стеклу отмокнуть в буфере для промывки после гибридизации.
	• Фиксированный срез ткани (плохое окрашивание DAPI)	• Сокращенное время фиксации ткани перед заливкой парафином может привести к чрезмерному расщеплению и/или предварительной обработке образца. Уменьшите время расщепления протеазой или время инкубации раствора для предварительной обработки и/или температуру в пределах допустимого диапазона.

Обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular для получения дополнительной помощи.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количество сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 на ядро записывают в столбцах. Результаты подсчета 20 интерфазных ядер опухолевых клеток на мишень представлены в виде отношения общих сигналов HER-2/*neu* к сигналам CEP 17. Амплификация определяется как отношение сигналов LSI HER- 2/*neu* к CEP 17 ≥ 2,0; без амплификации определяется как коэффициент < 2,0.

Результаты, близкие к пороговой точке (1,8-2,2), следует интерпретировать с осторожностью. В случае пограничного результата (от 1,8 до 2,2), особенно если также наблюдается вариабельность подсчетов от ядра к ядру, следует провести подсчет еще 20 ядер. Другой специалист должен повторно подсчитать предметное стекло для проверки результатов. Если все еще есть сомнения, анализ следует повторить со свежим предметным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Причины повторения анализа

Ниже приведены ситуации, требующие повторных анализов с использованием свежих предметных стекол. Смотрите Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак желудка) в **таблице 24**, чтобы узнать о возможных причинах и действиях, необходимых для устранения конкретных проблем.

1. Если имеется менее 20 поддающихся оценке ядер, тест считается неинформативным, и анализ следует повторить.
2. Если какой-либо из критериев качества предметных стекол (морфология ядра, интенсивность сигнала и фон) не соответствуют требованиям, как описано в разделе «Подсчет сигналов», анализ необходимо повторить.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Набор для анализа на рак желудка PathVysion Kit II был оптимизирован только для идентификации и количественного определения хромосомы 17 и гена HER-2/*neu* в интерфазных ядрах из зафиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани желудка человека. Другие типы образцов или фиксаторов использовать не следует.
2. Эффективность набора PathVysion Kit II была подтверждена с использованием процедур, представленных только в этом листке-вкладыше. Модификации этих процедур могут повлиять на эффективность анализа.
3. Результаты анализа методом FISH могут быть неинформативными, если качество образца и/или подготовка предметных стекол не соответствуют требованиям.
4. Технологи, выполняющие подсчет сигналов FISH, должны уметь визуально различать оранжевый и зеленый сигналы.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатель эффективности

Показатель эффективности набора PathVysion Kit II определяли как для ручных процедур, так и для процедур предварительной обработки VP 2000. Показатель эффективности определяется как процент информативных образцов от общего числа испытанных образцов. При использовании ручной предварительной обработки 19 зафиксированных формалином и залитых парафином образцов рака желудка (4 HER-2/*neu*-положительных и 15 HER-2/*neu*-отрицательных, как было определено в иммуногистохимическом анализе [IHC]) были протестированы в 4 повторностях, всего 76 предметных стекол. При использовании предварительной обработки VP 2000, 19 образцов были протестированы в двух повторностях, всего 38 предметных стекол. Каждое предметное стекло оценивали на интенсивность сигнала, специфичность сигнала, фон предметного стекла и общее качество, чтобы определить производительность набора PathVysion Kit II.

В случае процедуры ручной предварительной обработки показатель эффективности набора составил 100% (96,1%, нижняя граница 95% ДИ). В случае процедуры предварительной обработки VP 2000 показатель эффективности набора составил 100% (92,4%, нижняя граница 95% ДИ). Результаты представлены в **таблице 25**.

Таблица 25. Показатель эффективности

Процедура	Кол-во испытанных предметных стекол	Кол-во прошедших испытание предметных стекол	Показатель эффективности набора (%)	Нижняя граница 95% ДИ
Ручная обработка	76	76	100%	96,1%
VP 2000	38	38	100%	92,4%

Аналитическая специфичность

Для получения результатов по аналитической специфичности см. раздел **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ** при раке молочной железы данного листка-вкладыша.

Воспроизводимость

Воспроизводимость набора PathVysion Kit II оценивали с использованием зафиксированных формалином и залитых парафином образцов рака желудка. Четыре образца рака желудка (2 HER-2/*neu*-положительных и 2 HER-2/*neu*-отрицательных, как было определено в иммуногистохимическом анализе [IHC] анализа) были протестированы в 4 повторностях в течение 5 дней подряд (1 анализ в день). Каждое предметное стекло оценивали на качество и считывали 3 ридерами для определения статуса амплификации HER-2/*neu*. Результаты тестирования на статус амплификации HER-2/*neu* сравнивали с результатами анализа IHC для оценки воспроизводимости набора PathVysion Kit II. Набор PathVysion Kit II продемонстрировал воспроизводимость со 100% общей согласованностью как в случае анализа на воспроизводимость от ридера к ридеру, так и в случае анализа на ежедневную (воспроизводимость (от анализа к анализу). Результаты представлены в **таблице 26** и **таблице 27**.

Таблица 26. Воспроизводимость: от ридера к ридеру

Ридер	Кол-во, соответствующее IHC	Кол-во, не соответствующее IHC
1	80	0
2	80	0
3	80	0

Согласованность в процентах: (240/240) = 100%

Таблица 27. Воспроизводимость: ежедневная (от анализа к анализу)

День/Этап	Кол-во, соответствующее IHC	Кол-во, не соответствующее IHC
1	48	0
2	48	0
3	48	0
4	48	0
5	48	0

Согласованность в процентах: (240/240) = 100%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Resarch on Cancer; 2010. http://globocan.iarc.fr. По состоянию на 9 января 2011 г.
2. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: an NSABP update. *Cancer*. 1983;52(9):1551-1557.
3. Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G. Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects (NSABP): Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer*. 1990;65(9)(Suppl):2121-2128.
4. Mansour EG, Gray R, Shatila AH, et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer: an intergroup study. *N Engl J Med*. 1989;320(8):485-490.
5. Bonadonna G, Valagussa T, Zambetti M. Milan adjuvant trials for stage I-II breast cancer. In: Slamon SW, ed. *Adjuvant Chemotherapy of Cancer* V. Orlando, FL: Grune & Stratton. 1987:211-21.
6. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-182.
7. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer: International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncology*. 1992;10(7):1049-1056.
8. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer*. 1991;63(3):434-438.
9. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 1990;50(14):4332-4337.
10. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1989;7(8):1120-1128.
11. Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM. ERBB-2 (HER2/*neu*) gene copy number, $p185^{HER-2}$ overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res.* 1995;55(22):5400-5407.
12. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu Gene Amplification Detected by Fluorescence in Situ Hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, Proceedings of the American Association for Cancer Research. 1994;35:545.
13. Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, Benz C, Waldman F. Phenotype genotype relationship in ERBB-2 amplification. Abstract 536D, International Society for Analytical Cytology. 1994:92.
14. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(12):5321-5325.
15. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/ neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res.* 1994;54(10):2771-2777.
16. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9742):687-697.
17. Yano T, Doi T, Ohtsu A, et al. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2006;15(1):65-71.
18. Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52(7):797-805.
19. Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA, et al. Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. *Brit J Cancer*. 2011;104(9):1372-1376.
20. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
21. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
23. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
24. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci.* 2000;30(1):41-48.
25. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996;13(1):63-72.
26. Mass R, Sanders C, Kasian C, Johnson L, Everett T, Anderson S. The Concordance Between the Clinical Trials Assay (CTA) and Fluorescence in situ Hybridization (FISH) in the Herceptin Pivotal Trials [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19. 2000(291).
27. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;93(1):3-11.
28. Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab [abstract]. *Clin Breast Cancer*. 2005;6(3):240-246.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОМОЩЬ

Для получения технической помощи позвоните в техническую службу компании Abbott Molecular по телефону + 49-6122-580, напишите по электронной почте на адрес molicalsupport@abbott.com или посетите веб-сайт компании Abbott Molecular по адресу http://www.abbottmolecular.com.

PathVysion, CEP, LSI, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, ProbeChek, AutoVysion и VP 2000 являются товарными знаками группы компаний Abbott в различных юрисдикциях.

HERCEPTIN® является зарегистрированным товарным знаком компании Genentech, Inc.

ThermoBrite является товарным знаком компании Iris Sample Processing, Inc.

Все другие товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

Набор ДНК-зондов PathVysion HER-2 II и другие различные продукты ДНК-зондами для FISH с прямой меткой защищены патентами США 5,663,319 и 5,491,224. Флуоресцентные зонды Vysis LSI, CEP и WCP с прямой меткой подпадают под действие патентов США RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696, 6,475,720, и 6,607,877 лицензирующих исключительно компанию Abbott Molecular Inc. попечительским советом Калифорнийского университета. Комплект PathVysion II защищен патентом США 5,985,553, выданным компании Vysis на неисключительных основаниях Соединенными Штатами Америки в лице Министерства здравоохранения.

Адрес производителя

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. Иллинойс 60018,
США

CE

Адрес уполномоченного представителя (УП)

EC REP
ABBOTL QMBH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Висбаден
Германия

© 2006, 2016 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Май 2016 г.
30-608493/R6

/Логотип: Abbott/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ANEUVYSION Multicolor DNA Probe Kit
REF 05J38

30-608368/R6

Изменения выделены

Используемые символы

	Официальный производитель
REF	Номер списка
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
GTIN	Глобальный номер товара
Σ	Количество достаточно для <n> тестов
	Температурный режим
	Биологический риск
CONTROL -	Отрицательный контроль
CONTROL +	Положительный контроль
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. инструкцию по применению
	Использовать до (срок годности)
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

Набор Aneuvysion многоцветный
(Vysis CEP 18/X/Y-альфа сателлит/LSI 13/21)
Номер партии 32-161075, каталожный номер 05J38-030;
Номер партии 33-161075, каталожный номер 05J38-010;
Номер партии 35-161075, каталожный номер 05J38-050

ФИРМЕННОЕ НАЗВАНИЕ ПРОБЫ

Многоцветная ДНК-проба AneuVysion (Vysis CEP 18, X, Y-альфа сателлит, LSI 13 и 21)

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ

Реагенты для проведения флуоресцентной гибридизации in situ

НАЗАЧЕНИЕ ПРОБЫ

AneuVysion (Vysis CEP 18, X, Y-alha salellite, LSI 13 и 21) многоцветная проба предназначена для детекции альфа-сателлитных сиквенсов в центромерных регионах хромосомы 18, X и Y-хромосомы и LSI 13/21 пробы для детекции 13q14 региона, 21q22.13 и 21q22.2 регионов. Набор AneuVysion предназаначен для идентификации и увеличения числа хромосом: 13, 18, 21, X и Y методом FISH в метафазных клетках и интерфазных ядрах, выделенных из амниотической жидкости у беременных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

женщин с высокой степенью риска. Данная проба не предназначена для использования в качестве самостоятельного анализа при принятии клинических диагнозов. Результаты FISH предназначены для использования в качестве помощи в диагностике численных аномалий хромосом 13, 18, 21 X или Y в сочетании с другой информацией в настоящее время используются в пренатальной диагностике в соответствии с профессиональными стандартами на практике. Наборы для FISH диагностики предназначены только для использования с амниотическими клетками; наборы не могут быть использованы и не могут быть валидированы с другими матрицами. Данная FISH диагностика не предназначена для детекции структурных хромосомных аномалий, что также может привести к врожденным дефектам. Данный FISH анализ проводится в лаборатории цитогенетики.

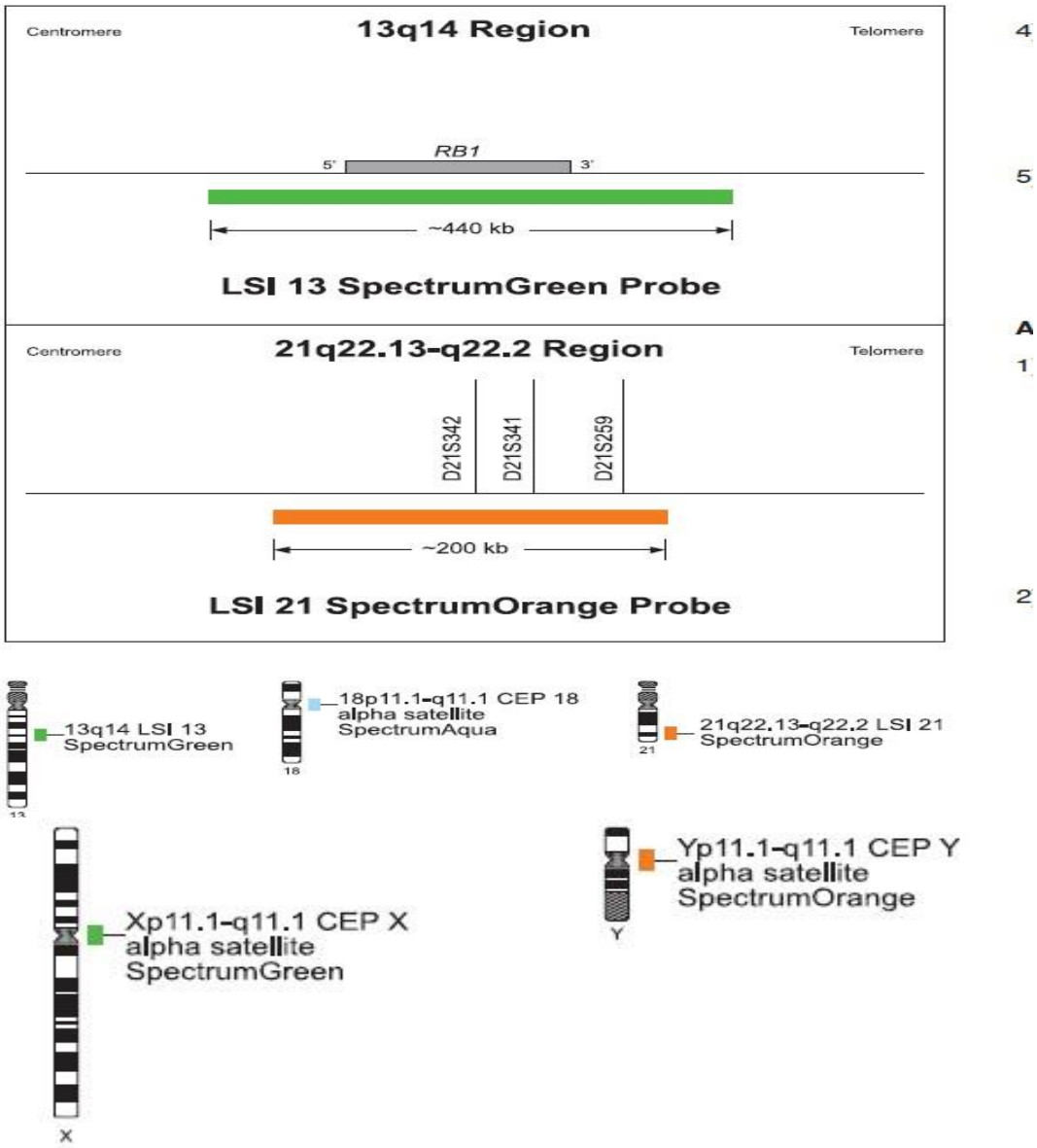
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И РАЗЪЯСНЕНИЕ

Женщинам с высоким риском развития хромосомных аномалий предлагается рутинный амниоцинтест с последующим цитогенетическим анализом фетальных клеток. Показаниями к пренатальной диагностике является возраст, повышенный риск трисомии для плода, выявляемый в материнской сыворотке путем скрининга, желание самой матери и плохие результаты ультразвукового исследования. В настоящее время хромосомные аномалии диагностируются стандартным хромосомным анализом (кариотип), метод для детекции анеуполидии 13, 18, 21 и Y – хромосомы и с высокой точностью выявляет видимые структурные аномалии. Метод FISH с использованием хромосом-специфических ДНК-зондов может использоваться для оценки численных аутомосомных аббераций в интерфазных клетках в прямых или в культивированных образцах препаратов амниотической жидкости. Поскольку обработка образца для интерфазного FISH-анализа не требует выделения и очистки ДНК и/или мечение ДНК-пробы радиоактивной меткой, результаты FISH обычно получают до начала стандартного хромосомного анализа. Результаты FISH могут быть представлены достаточно быстро, однако клиническое действие принятия решения на основе результатов FISH должны быть тщательно рассмотрены наряду с другими медицинскими доказательствами, используемыми в настоящее время в пренатальной диагностике.

ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

In situ гибридизация представляет собой метод, который позволяет визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот в клеточной популяции. В частности, ДНК FISH включает точный отжиг одноцепочечной меченой флуорохромом ДНК-пробы, комплементарной мишени последовательности. Гибридизованная проба с ДНК визуализируется под флуоресцентным микроскопом. Клетки из образцов амниотической жидкости наносятся на стеклянные слайды с использованием стандартных цитогенетических протоколов. Полученный образец ДНК денатурируют до одноцепочечной ДНК, что в последствии дает возможность гибридизации с CEP18/X/Y и LSI 13/21 пробой. После гибридизации не связавшаяся проба удаляется путем серии отмывок, а хромосомы и ядра прокрашиваются специфическим контркрасителем DAPI, вызывающим голубую флуоресценцию. Гибридизация CEP 18/X/Y и LSI 13/21 визуализируется с использованием флуоресцентного микроскопа, оснащенного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссии, позволяющими визуализировать интенсивность оранжевого, зеленого и голубого флуоресцентных сигналов и окрашенных в голубой цвет хромосом и ядер. Увеличение числа 13, 18, 21, X и Y хромосом проводится с помощью микроскопического исследования интерфазных ядер. Флуоресцентно окрашенные хромосомы ярко выделяются на фоне голубого свечения ядерной ДНК. FISH-методика позволяет визуализировать увеличенное число хромосом 13, 18, 21, X и Y внутри ядра.

CEP 18/X/Y проба представляет собой смесь прямо меченых ДНК-зондов, специфичных для D18Z1, DXZ1, и DYZ3 регионов хромосом 18, X и Y соответственно. Проба LSI 13/21 содержит смесь уникальных ДНК-сиквенсов, которые гибридизуются в 13q34 регионе хромосомы 13 и уникальные ДНК-сиквенсы, комплементарные D21S259, D21S341, и D21S342, содержащиеся в 21q22.13 и 21q22.2 области на длинном плече 21-й хромосомы. Проба LSI 13 была создана из набора перекрывающихся клонов, которые содержат весь ген RB1, а также областей, выходящих за пределы гена с обеих сторон. Проба выходит за пределы 180 Kb гена RB1 от 110 до 170 Kb в 5' направлении и приблизительно 120 Kb в 3' направлении, вся проба имеет размер от 410 до 470 Kb. CEP 18/X/Y это трехцветная проба, смесь голубого, оранжевого и зеленого флуорохромов и LSI 13/21 это смесь зеленого и оранжевого флуорохромов. Обе смеси зондов предварительно денатурируют в гибридизационном буфере для простоты использования.



РЕАГЕНТЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Поставляемые реагенты:

AneuVysion Kit - 10 Assay (Номер партии 33-161075, каталожный номер 05J38-010)

1) LSI 13/21 ДНК проба: Низкое число копий вектора E.coli Номер партии: 33-171076
Количество: 100 мкл/ на флакон (50 нг/мл)
Условия хранения: - 20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: Меченая флуорохромом проба LSI 13 SpectrumGreen и ДНК-проба LSI 21, меченая SpectrumOrange с блокирующей ДНК и гибридизационным буфером (сульфат декстрана, формамид и буфер SSC).

2) CEP 18/X/Y ДНК-проба: плазмида E. Coli
(проба предварительно денатурирована) Номер партии: 33-171075
Количество:100 мкл/ на флакон (25 нг/мл)
Условия хранения: -20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: SpectrumAqua меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК 18 проба, SpectrumGreen меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК X проба и SpectrumOrange меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК Y проба предварительно смешанная с флуорохромами SpectrumGreen, SpectrumOrange SpectrumAqua и немеченая блокирующая ДНК, а также гибридизационный буфер (декстрана сульфат, формамид, SSC).

3) Контркраситель DAPI II
Номер партии: 30-804861
Количество: 600 мкл на 1 флакон
Условия хранения: -20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: 125 нг/мкл DAPI (4,6 –диамидино –2-фенилиндол в фенилендиамине дигидрохлориде, глицерол и буфер.

4) NP-40
Номер партии: 30-804820

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Количество: 4 мл/ 2 флакона Условия хранения: -20 до 25°C
Состав: неионный детергент
5) 20X SSC
Номер партии: 30-805850
Количество: 66 г/ на 1 контейнер
Условия хранения: -20 до 25°C Состав: хлорид натрия цитрат натрия

AneuVysion набор - 30 исследований (Part No. 32-161075, list No. 05J38-030)
1) LSI 13/21 ДНК проба: Низкое количество копий вектора E.coli (проба преденатурирована) Номер партии: 30-171078
Количество: 300 мкл/ 1 флакон (50 нг/мкл)
Условия хранения: - 20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: Меченая флуорохромом проба LSI 13 SpectrumGreen и ДНК-проба LSI 21, меченая SpectrumOrange с блокирующей ДНК и гибридизационным буфером (сульфат декстрана, формамид и буфер SSC).
2) CEP 18/X/Y ДНК-проба: плазмида E. Coli (проба предварительно денатурирована) Номер партии: 30-171077
Количество: 300 мкл/ на флакон (25 нг/мл)
Условия хранения: - 20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: SpectrumAqua меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК 18 проба, SpectrumGreen меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК X проба и SpectrumOrange меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК Y проба предварительно смешанная с флуорохромами SpectrumGreen, SpectrumOrange и SpectrumAqua и немеченая блокирующая ДНК, а также гибридизационный буфер (декстрана сульфат, формамид, SSC).
3) Контркраситель DAPI II
Номер партии: 30-804861
Количество: 1200 мкл/ 2 флакона
Условия хранения: - 20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: 125 нг/мкл DAPI (4,6 – диамидино – 2-фенилиндол в фенилендиамине дигидрохлориде, глицерол и буфер.
4) NP-40
Номер партии: 30-804820
Количество: 4 мл/ 2 флакона Условия хранения: -20 до 25 °C Состав: неионный детергент
5) 20X SSC
Номер партии: 30-805850
Количество: 66 г/ на 1 контейнер Условия хранения: -20 до 25°C Состав: хлорид натрия цитрат натрия
AneuVysion Kit - 50 Assay (Part No. 35-161075, list No. 05J38-050)
1) LSI 13/21 ДНК проба: Низкое количество копий вектора E.coli
Номер партии: 35-171078
Количество: 500 мкл/ 1 флакон (500 нг/мкл)Условия хранения: -20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: Меченая флуорохромом проба LSI 13 SpectrumGreen и ДНК-проба LSI 21, меченая SpectrumOrange с блокирующей ДНК и гибридизационным буфером (сульфат декстрана, формамид и буфер SSC).
2) CEP 18/X/Y ДНК-проба: плазмида E. Coli
(проба предварительно денатурирована) Номер партии: 35-171077
Количество: 500 мкл/ на флакон (25 нг/мл)
Условия хранения: - 20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: SpectrumAqua меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК 18 проба, SpectrumGreen меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК X проба и SpectrumOrange меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК Y проба предварительно смешанная с флуорохромами SpectrumGreen, SpectrumOrange и SpectrumAqua и немеченая блокирующая ДНК, а также гибридизационный буфер (декстрана сульфат, формамид, SSC).
3) Контркраситель DAPI II
Номер партии: 30-804861
Количество: 1200 мкл/ 2 флакона
Условия хранения: -20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: 125 нг/мкл DAPI (4,6 –диамидино –2-фенилиндол в фенилендиамине дигидрохлориде, глицерол и буфер.
4) NP-40
Номер партии: 30-804820

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Количество: 4 мл/2 флакона Условия хранения: -20 до 25°C Состав: неионный детергент
5) 20X SSC Номер партии: 30-805850
Количество: 66 г/ на 1 контейнер Условия хранения: -20 до 25°C Состав: хлорид натрия цитрат натрия

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА

Хранить неоткрытый набор AneuVysion при температуре -20 °C (±5°C) в защищенном от света и влажности месте. 20X SSC и NP-40 должны храниться отдельно при комнатной температуре. Дата окончания срока годности для каждого компонента указана отдельно на индивидуальной этикетке. Эти условия хранения применяются как для открытых для и не для открытых компонентов. Следует избегать воздействия света, тепла и влажности, что может повлиять на сроки годности хранения некоторых компонентов набора. Если компоненты хранятся в условиях, отличных от указанных на этикетках, это может негативно повлиять на результаты анализа.

Необходимые, но не поставляемые материалы

Примечание: Если условия хранения не перечислены внутри упаковки или на этикетке продукта, хранить реагенты необходимо в соответствии с рекомендациями поставщика.

Лабораторные реагенты

 ProbeChek Normal Male Amniocyte Control Slides, Part No. 30-805010, List No. 05J39-005. Фиксированные биологические образцы, полученные от нормальных человеческих амниоцитов, помещенные на слайды к микроскопу. Количество: 5 слайдов (10 целевых областей). Хранить контрольные слайды при температуре -20°C (±5°C) в герметичном контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности.

 ProbeChek Пренатальные положительные контрольные слайды Part No. 30-805017, List No. 05J36-005. Фиксированные биологические образцы, выделенные из человеческих фибробластных клеток, помещенные на слайды к микроскопу. Количество: 5 слайдов (10 целевых областей). Хранить контрольные слайды при температуре - 20°C (±5°C) в герметичном контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности.

 Формамид, высокоочищенный

 Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.

 Концентрированная (12N) соляная кислота (HCl)

 1N гидроксид натрия (NaOH)

 Очищенная вода (дистиллированная или деонизированная). Хранить при комнатной температуре.

 Фиксатор (3:1 метанол: уксусная кислота). Готовится ежедневно.

 Осушитель

 1X трипсин/ЭДТА (0,05% трипсин, 0,53 Мм ЭДТА–4Na в сбалансированном солевом растворе Хенкса без CaCl, $MgCl_2$

 0,56% хлорид калия (KCL)

 Реагенты для оптимальной пробоподготовки клеток амниотической жидкости:

 Рабочий раствор пепсина (2,5 мг пепсина добавляют к 50 мл 0,01 N HCl)

 Постфиксационный раствор (1,3 мл 37% формальдегида, 0,23 $MgCl_2$ и 48,7 мл PBS)

Лабораторное оборудование

 Флуоресцентные микроскопы с рекомендуемыми фильтрами

 Фазово-контрастный световой микроскоп

 Предварительно очищенные предметные стекла

 Слайды (от 45 до 50°C)

 22 мм× 22 мм покровные стекла

 Микродозаторы (от 1 до 10 мкл) с наконечниками

 Таймер

 Микроцентрифуги

 Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)

 Водяные бани (от 70 до 80°C)

 Водяные бани (37°C)

 Устойчивый маркер

 Ножницы

 Одноразовый шприц (5 мл)

 Одноразовые пипетки (от 5 до 20 мл)

 Сосуды Коплина (12×50 мл). Рекомендуемый тип: Продукт Уинтон №900570 вертикальный сосуд для окрашивания.

 Калибровочные термометры

 Коробочка с крышкой из слайдов для микроскопа

- Магнитные мешалки
- pH метр и лакмусовая бумага
- Вортекс
- 0,45 мм фильтрационные единицы
- 37°C инкубатор
- Слайды (45 до 50°C)
- Штативы для пробирок
- Клей
- Фильтры с диаметром пор 0,45 мкм

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH.

Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы- производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Одиночные или двойные фильтры к флуоресцентному микроскопу оптимизированы для использования с набором AneuVysion и доступны у Abbott Molecular для большинства моделей микроскопа. Рекомендуемые фильтры для набора AneuVysion это оранжевый, зеленый и голубой одиночные фильтры и тройные фильтры DAPI/Зеленый/Оранжевый. Конфигурация этих трех фильтров позволяет производить одновременное возбуждение и излучение флуорофоров SpectrumGreen, SpectrumOrange и DAPI. Сигналы SpecrumOrange будут оранжевого цвета, сигналы SpectrumGreen будут зеленовато-желтоватого цвета. Все другие молекулы ДНК будут флюоресцировать голубым цветом как результат окрашивания конткрасителем DAPI.

Приготовление рабочих растворов реагентов20X SSC (pH 5.3):

Смешайте:

66г	20X SSC
200 мл	очищенной воды
250	мл общий объем

Тщательно перемешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите до pH 5.3 концентрированной HCl, если необходимо. Доведите общий объем до 250 мл. Профильтруйте через 0.45 мкм фильтр. Хранить в закрытом контейнере при комнатной температуре до 6 месяцев.

Раствор для денатурации

Смешайте вместе:

49 мл	Формамида
7 мл	20XSSC pH 5,3
14 мл	Очищенная вода
70 мл	Общий объем

Спиртовые растворы

Приготовьте разведения 70%, 85% и 100% растворов, используя 100% этанол и очищенную воду. Добавьте 70 мл каждого раствора в сосуды Коплина и храните при комнатной температуре. Неиспользуемые растворы хранить в закрытых контейнерах в течении 6 месяцев. Используемые для проведения анализы растворы могут быть использованы в течении недели, если не произошло испарение растворов или если растворы становятся чрезмерно разбавленными после многократного использования.

0.3% NP-40 в 0.4X SSC (Раствор для промывки после гибридизации):
Смешайте вместе:
950 мл очищенной воды
20 мл 20X SSC pH 5.3
3 мл NP-40
1000 мл общий объем
Смешайте интенсивно. Доведите объем до 1000 мл очищенной водой. Тщательно перемешайте. Доведите pH до 7.0-7.5 1N NaOH, при необходимости, используя pH метр со стеклянным pH электродом. Профильтруйте через 0,45 мкм фильтр. Хранить неиспользованный раствор в закрытом контейнере при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Утилизировать раствор, который был использован в исследовании в конце каждого дня.
0.1% NP-40 в 2X SSC (Раствор для промывки после гибридизации):
Смешайте:
100 мл 20XSSC pH 5.3
849 мл очищенной воды
1 мл NP-40
1000 мл общий объем
Интенсивно перемешать. Доведите объем до 1000 мл очищенной водой. Тщательно перемешайте. Доведите pH до 7.0-7.5 1N NaOH, при необходимости, используя pH метр со стеклянным pH электродом. Профильтруйте через 0,45 мкм фильтр. Добавьте 70 мл в сосуд Коплина и храните при комнатной температуре. Хранить неиспользованный раствор в закрытом контейнере при комнатной температуре до 6 месяцев. Утилизировать раствор, который был использован при количественном определении в конце каждого дня.
Примечание: для обработки образца и процедуры подготовки слайдов необходимы дополнительные реагенты. Обратитесь к конкретному разделу для получения деталей.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:
ПРЕДНАЗНАЧЕНО ДЛЯ ДИАГНОСИКИ IN VITRO
1. Для диагностики in vitro.
2. Со всеми биологическими образцами следует обращаться как с потенциальными источниками инфекционных агентов. Контрольные препараты из этого набора изготовлены из клеточных линий человека, фиксированных в растворе метанола и уксусной кислоты (3:1). *Часто невозможно убедиться в инфекционной безопасности образца, поэтому со всеми образцами человека и контрольными препаратами следует обращаться, соблюдая универсальные меры предосторожности. Руководство по обращению с такими образцами можно получить в Центрах контроля и профилактики заболеваний США.*
3. Условия гибридизации могут изменяться при использовании других реагентов, кроме реагентов, поставляемых Vysis, Inc.
4. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и детекции может привести к получению неприемлемых или неправильных результатов.
5. Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Это относится и ко всем этапам работы с гибридизованными препаратами. Проводите все манипуляции, не требующие света (инкубация, промывка и т.д.), в темноте.
6. Набор содержит формамид, являющийся тератогеном. Не допускайте его контакта с кожей и слизистыми.
7. Измерение температуры растворов, водяных бань и инкубаторов следует проводить градуированными термометрами, т.к. температура является критической при выполнении анализа.
8. Все опасные материалы следует утилизировать в соответствии с местными и государственными правилами.

Заявление о биобезопасности для компонентов набора
- **LSI 13/21 ДНК-проба**
- **CEP 18/X/Y ДНК-проба**

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

- **LSI 13/21 ДНК-проба и CEP 18/X/Y DNA**

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

NP-40

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки:

H315	Может вызвать повреждения кожи
H319	Может вызвать повреждения глаз
P280	Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, защиту для глаз
P264	После работы тщательно помойте руки.
P305+	При попадании в глаза: Промойте обильно водой в течении нескольких минут.
P351+P338	Снимите контактные линзы, если они есть и продолжайте промывать водой.
P302+P352	При попадании на кожу: обильно промыть водой
P337+P313	В случае попадания в глаза: Обратитесь за медицинской помощью
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular

СБОР ОБРАЗЦОВ, ОБРАБОТКА И ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА СЛАЙДОВ

Сбор образцов и их обработка

Набор AneuVysion разработан для использования как на культивируемых так и на некультивируемых амниоцитах. Сбор амниотической жидкости должен быть проведен в соответствии с руководством лаборатории. Руководство ACT содержит ряд рекомендаций по сбору и культивированию образцов. Образцы амниотической жидкости должны быть собраны таким образом, чтобы свести к минимуму риск контаминации материнскими клетоками. Для уменьшения контаминации ACOG рекомендует удалить первые один или два мл амниотической жидкости. Для сбора амниотической жидкости ACT рекомендует использовать шприц с герметиком, который не влияет неблагоприятно на рост клеток и специально маркированные контейнеры, одобренные для культивирования клеток. Рекомендуются также предварительно упакованные амниоцентезные лотки. Минимальный объем амниотической жидкости, рекомендованной для проведения FISH исследования от 2 до 5 мл в зависимости от гестационного

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

возраста. Пользователи должны внимательно взвесить все за и против использования аликвот образца для выполнения FISH –исследования, когда объем образца не соответствует минимальным требованиям как для FISH-метода так и для цитогенетических методов. См. **таблицу 1.** Согласно руководству ACT время от сбора амниотической жидкости до культивирования должно быть максимально коротким, насколько это возможно (незамедлительно) и следует также соблюдать осторожность при воздействии высоких температур. Образцы не должны замораживаться и размораживаться.

Кровавые образцы могут помешать правильному культивированию стандартным цитогенетическим анализом. Следует также избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований и высоких температур. Такие условия как известно могут повредить ДНК и могут привести к неудачному проведению FISH-исследования. Образцы околоплодных вод, которые имеют кровавый или коричневый цвет, не должны использоваться, т.к. эти образцы могут содержать материнскую кровь.

Таблица 1. Рекомендуемые объемы амниотической жидкости для FISH-исследования и стандартного хромосомного анализа

	Объем (мл)		
Беременность (Недели)	**Общий объем (мл)**	**Зарезервировано для стандартного хромосомного анализа**	**Минимальный объем (мл) для FISH**
11 до 15	14	12	2
16	16	13	3
17	16	13	3
18	18	14	4
19	18	14	4
20 до 27	25+	15+	5+

Подготовка слайдов из некультивируемой амниотической жидкости

Используется следующий метод для подготовки слайдов из некультивируемых образцов амниотической жидкости.

1. Центрифугировать от 2 до 5 мл образцов цельной амниотической жидкости в течении 5 минут при 1000 об./мин. Образец не должен быть кровавого или коричневого цвета.
2. Ресуспензировать осадок в 2-5 мл 1X трипсина/ЭДТА (0,05% трипсин, 0.53 мМ ЭДТА в солевом растворе Хэнкса без $CaCl_2$, $MgCl_2*6H_2O$, и $MgSO_4*7H_2O$ и инкубировать при 37±1°C на водяной бане в течении по крайней мере 15 минут.
3. Центрифугировать суспензию в течении 5 мин. При 1000 об./мин.
4. Ресуспензировать осадок в 2-5 мл 0.56% KCl и инкубировать в течении 20 минут при 37±1°C на водяной бане.
5. Добавить от 0.8 до 2 мл фиксатора (3:1 метанол: ледяная уксусная кислота) и клетки/гипотонический раствор и аккуратно перемешайте на вортексе.
6. Отцентрифугируйте суспензию в течении 5 минут при 1000 об./мин. и ресуспензируйте осадок в 1 мл свежего фиксатора. Храните фиксированные образцы при 4°C по крайней мере в течении 30 минут или до выполнения FISH-исследования. При более длительном хранении, хранить фиксированные образцы при -20°C (±5°C) в фиксаторе.
7. Перед помещением клеток на слайды, отрегулируйте объем клеточной суспензии согласно размеру клеточного осадка. При необходимости, особенного после длительного хранения (>1 месяца), промойте осадок с фиксатором перед подготовкой слайдов.
8. Перед подготовкой слайдов для FISH, капните суспензию клеток прямо на 1 или 2 холодных стекляных предметных стекла, создавая тем самым 2 гибридизационных области (15 до 25 мл клеточной суспензии для каждой области).
9. Перейдите к предварительной обработке клеток некультивируемой амниотической жидкости.

Если не были произведены оптимальные стандартные процедуры предварительной обработки, опустите слайды в 2X SSC от 30 мин. до 1 часа при 37°C или при комнатной температуре на 24 часа с открытой крышкой перед гибридизацией или хранением.

Предобработка для клеток некультивируемой амниотической жидкости (оптимально)

Следующий метод может быть использован для предварительной обработки образцов слайдов, подготовленных из образцов некультивируемой амниотической жидкости. Эта процедура рекомендуется для достижения оптимальных результатов FISH-исследования. Предварительная обработка особенно полезна для образцов позднего гестационного возраста и образцы сразу должны быть гибридизованы после приготовления слайдов.

1. Поместите слайды, подготовленные из некультивируемых амниоцитов, в 2X SSC на один час при температуре 37±1°C.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Поместите слайды к только что приготовленный рабочий раствор пепсина (к 2.5 мг пепсина добавляют 50 мл 0.01 N HCl) на 13 минут при 37±1°C.
3. Промыть слайд (ы) в фосфатно-солевом буфере (ПБС) при комнатной температуре в течении 5 минут.
4. Поместите слайды в раствор после фиксации (0.95% формальдегид: 1.3 мл 37% формальдегида, 0.23 г $MgCl_2$ и 48.7 мл ПБС. Хранить при температуре 4°C. Использовать в течении месяца) на 5 минут при комнатной температуре.
5. Промыть слайды в ПБС при комнатной температуре в течении 5 минут.
6. Высушить слайды. Для ускорения высыхания, используйте Пастеровскую пипетку, направив поток сжатого воздуха на слайд.
7. Погрузите слайды в 70% этанол при комнатной температуре. Необходимо, чтобы слайды постояли в промывочном растворе этанола 70% в течении одной минуты.
8. Удалите слайды из 70% этанола. Повторите шаг 7 с 85% этанолом, и затем с 100% этанолом.
9. Денатурируйте слайды в соответствии с инструкцией внутри упаковки.

Подготовка слайдов для фиксированного клеточного осадка из культивируемых образцов.

Для подготовки слайдов из культивируемых образцов может быть использован следующий метод.
1. Поместите водяную баню и полоски влажности в специальную камеру, расположенную на передней панели. Накройте переднюю часть устройства полиэтиленовой пленкой, но не полностью, чтобы обеспечить доступ к внутренним районам. Если показания комнатного гигрометра ниже 45%, используйте увлажнители воздуха.
2. Прогрейте водяную баню до 67±2°C. Поместите штативы для пробирок в центр водяной бани, чтобы они не касались стенок бани. Поддерживайте уровень воды в верхней части штатива для пробирок на протяжении всей процедуры, не допуская попадания воды на низ слайдов.
3. Приготовьте клеточный осадок с фиксатором, чтобы суспензия была слегка замутненной.
4. Очистите предметное стекло микроскопа, намочив обе стороны слайда 70% этанолом (выдавите из бутылки). Протрите слайд насухо, с использованием лабораторных салфеток и проведя по всей длине слайда до маркированного конца. Используйте карандаш, чтобы нанести отметку на слайд.
5. Поместите слайд в сосуд Коплина, содержащий фиксатор. Наклоните слайд таким образом, чтобы покрыть фиксатором поверхность слайда.
6. Незамедлительно поместите слайд над водяной баней. Удерживая пипетку Пастера над слайдом на уровне 2-4 дюймов, нанесите 3-4 капли суспензии клеток по всей длине слайда.
7. Поместите слайд образцом вверх на подставке для пробирок на водяной бане. Дайте слайду высохнуть в течении 10 минут.
8. Переместите слайд с подставки для пробирок и просмотрите под фазово-контрастным микроскопом. Изучите количество ядер на поле под низким увеличением (10X объектив). Для оптимального анализа необходимо приблизительно 100 клеток на поле. Скорректируйте клеточную суспензию путем добавления свежего фиксатора для достижения рекомендуемого количества интерфазных ядер.
9. Аккуратно обрисуйте область, содержащую интерфазные ядра на задней части слайда алмазным наконечником. Покровное стекло (22×22 мм) должно использоваться для формирования зоны гибридизации, обозначенная область должна быть в пределах области покровного стекла.
10. Погрузите образцы слайдов в 2X SSC на 30 минут или на час при 37±1°C или при комнатной температуре на 24 часа в закрытую коробку со слайдами до процесса гибридизации или перед хранением.

Хранение слайдов

Поместите подготовленные слайды в закрытую коробку для слайдов. Запечатайте слайд-боксы в пластиковый пакет, содержащий приблизительно одну столовую ложку Драйерита. Храните при температуре -20°C (±5°C) до гибридизации. Хранение образцов амниоцитов на подготовленных слайдах для FISH-анализа достаточно длительно не рекомендуется. Длительное хранение подготовленных слайдов может привести к плохому качеству сигнала. Когда амниоциты хранятся в соответствии с рекомендациями, FISH-анализ на свежеприготовленных слайдах неизменно приводит к лучшему качеству сигнала. В рутинном применении FISH-исследование обычно проводится сразу же после подготовки слайдов.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА: КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Денатурация ДНК в образце

1. Заранее подогрейте до 37□C увлажненную камеру для гибридизации (воздухонепроницаемый контейнер с кусочком влажной промокательной бумаги или бумажного полотенца размером примерно 1x3 дюйма, прикрепленным к стенке контейнера), поместив ее перед подготовкой препаратов в инкубатор с температурой 37□±2°C.
2. Налейте раствор для денатурации в емкость Коплина и поместите на водяную баню с температурой 73□1□C по крайней мере на 30 минут. Проверьте температуру раствора перед использованием.

3. Перед каждым использованием раствора для денатурации убедитесь, что его pH составляет 7,0-8,0. Проведите денатурацию ДНК в образце, погрузив подготовленные стекла в раствор для денатурации с температурой 73□1□C на 5 минут. Не проводите денатурацию более 4 препаратов в одной емкости Коплина одновременно.
4. С помощью пинцета извлеките стекла из раствора для денатурации и сразу погрузите их в промывочный раствор 70%-ного этанола комнатной температуры. Поболтайте стекло для удаления формамида. Оставьте стекла в этаноле на 1 минуту.
5. Извлеките стекла из 70%-го этанола. Повторите этап 4 с 85%-ным этанолом, а затем - 100%-ным этанолом.
6. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла лабораторной салфеткой.
7. Просушите стекла на нагревателе для стекол в течение не более 2 минут при 45-50□C, пока вы не будете готовы добавить раствор зондов.

Примечание: Если в процессе проведения гибридизации на подготовку зондов может понадобиться более двух минут, стекло необходимо оставить в емкости со 100% спиртом. Не давайте стеклу высохнуть на воздухе перед его помещением в нагреватель для стекол.

Подготовка зондов

1. Дайте раствору зондов прогреться до комнатной температуры, пока его вязкость не уменьшится достаточно для точного пипетирования.
2. Перемешайте на вортексе. Отцентрифугируйте каждую пробирку в течение 1-3 секунд с помощью настольной микроцентрифуги, чтобы содержимое пробирки стекло на дно пробирки. Снова аккуратно перемешайте на вортексе.

Гибридизация

1. Нанесите зонд на стекло. Сразу накройте эту область покровным стеклом размером 22 x 22 мм и дайте смеси равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха мешают гибридизации, поэтому не допускайте их образования.

Примечание: Не добавляйте раствор зондов на область-мишень, пока не подготовлены покровные стекла.

2. Закрепите покровное стекло резиновым герметиком следующим образом. Наберите герметик в шприц на 5 мл. Выдавите его небольшое количество по краям покровного стекла, захватывая и покровное, и предметное стекла, формируя таким образом изолирующий слой вокруг покровного стекла.
3. Поместите стекла в предварительно нагретую увлажненную камеру для гибридизации. Плотно закройте камеру крышкой и инкубируйте при 37□C в течение 6-24 часов.

Промывка после гибридизации

1. Налейте буфер для промывки после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40) в емкость Коплина. Подогрейте буфер, поместив емкость Коплина на водяную баню с температурой 73□1□C по крайней мере на 30 минут, или пока раствор не нагреется до 73□1□C. *Примечание: Промывочный раствор следует нагревать до 73□1□C перед промывкой каждой партии.*
2. Налейте буфер для промывки (2X SSC/0,1% NP-40) во вторую емкость Коплина и оставьте при комнатной температуре. Оба промывочных раствора можно использовать в течение 1 суток.
3. Удалите герметик с первого стекла, аккуратно потянув его пинцетом. Снимите покровное стекло с области-мишени, и немедленно перенесите стекло в емкость Коплина, содержащую 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73□1□C. Поболтайте стекло в буфере в течение 3 секунд. Повторить операцию для остальных стекол и инкубировать 2 мин. Не помещайте более чем 4 слайда в раствор одновременно. Если промывается более чем 4 слайда одновременно, убедитесь, что температура промывочного раствора 73□1□C перед каждым использованием.

Примечание: Не снимайте покровные стекла с нескольких предметных стекол перед их помещением в промывочную баню. Начните 2-минутный отсчет инкубации, когда последнее стекло будет добавлено в промывочную баню.

4. Извлеките каждое стекло из промывочной бани и поместите их в емкость, содержащую 2X SSC/0,1% NP-40, при комнатной температуре на 5-60 сек, встряхивая их в течение 1-3 сек после помещения в баню.
5. Высушите стекла на воздухе в темноте в вертикальном положении. (Подойдет закрытый ящик или полка внутри закрытого шкафа.)
6. Нанесите 10 мкл красителя DAPI II на отмеченную область стекла и накройте покровным стеклом. До проведения подсчета храните препараты в темном месте.

Хранение препаратов

Гибридизованные препараты (с покровными стеклами) храните при -20°C (±5°C) в темном месте. При этих условиях стекла могут храниться до 12 месяцев без существенной потери интенсивности флуоресцентного сигнала. При длительном хранении покровные стекла можно заклеить герметиком для предотвращения испарения, и предметные стекла храните при -20°C (±5°C).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подсчет сигналов

Оценка приемлемости препарата

Приемлемость препарата оценивается по следующим критериям:

- Интенсивность сигнала зонда: сигнал должен быть ярким, четким и легко оцениваемым. Сигналы должны быть в форме либо яркого овала с четкими границами, либо вытянутого овала с расплывчатыми границами.
- Фон: фон должен быть темным или черным и относительно свободным от флуоресцирующих частиц или помутнений.
- Специфичность объектной области в отношении перекрестной гибридизации: Зонд должен гибридизоваться и окрашивать только таргетную область хромосомы. Метафазные пластинки следует исследовать для идентификации любой перекрестной гибридизации необъектных последовательностей. По крайней мере, 98% клеток дают один или более сигналов для приемлемой гибридизации (см. правила по подсчету сигналов, описанные ниже). Если любой из выше перечисленных признаков не удовлетворяет критериям приемлемости, обратитесь к разделу по устранению возможных проблем (Таблица 2) и приготовьте новый препарат.

Выбор оптимального для анализа участка и ядер, подлежащих оценке

Для просмотра гибридизованной области и определения подходящего участка используйте объектив 25X. Выбирайте области, в которых образец распределен равномерно, лишь несколько интерфазных ядер или метафазных пластинок могут перекрываться, и несколько интерфазных ядер или метафазных пластинок могут быть просканированы в поле зрения. Не анализируйте ядра с нечеткими границами. Пропускайте ядра с сомнительными сигналами, требующими субъективного решения. Пропускайте сигналы слабой интенсивности и неспецифичные, а также при фоновых помехах. Пропускайте ядра, недостаточно окрашенные для определения их границ. Подсчитывайте только клетки с дискретными сигналами.

Подсчет сканирования

Используя объективы 40X или 63X начните анализ в верхнем левом квадранте выбранной области, сканируя слева направо, подсчитывая количество сигналов в каждой видимой метафазной области или внутри ядерной границы каждой оцениваемой интерфазной клетки. Площади на стекле с высокой плотностью клеток должны быть пропущены случайным образом для того, чтобы отсканировать цельные таргетные области. Продолжайте сканировать до тех пор, пока не насчитаете 50 ядер и не проанализируете таргетные области. Если ожидается мозаицизм (от 10 до 60% анеуплоидных клеток), 200 ядер на таргетную область должно быть перечислено. Таргетные области с менее чем 50 видимыми ядрами должны быть дополнены дополнительными слайдами или представляться как неинформативные случаи.

Подсчет интерфазных сигналов

Подсчитайте число флуоресцентных сигналов в каждом доступном интерфазном ядре с помощью объектива 40X или 63X. Следуйте инструкциям по подсчету сигналов в **Таблице 1** или **2**. Объективы с большим увеличением (например 63X или 100X) следует использовать для верификации или решения вопросов о слитном или диффузном сигнале.

- Два сигнала примерно одинакового размера, находящиеся друг от друга на близком расстоянии, но не имеющих видимого соединения, считаются как два сигнала.
- Считайте размытый сигнал как один сигнал, если сигнал непрерывный и в приемлемых границах.
- Два малых сигнала, имеющих видимое соединение, считаются как один сигнал.

- Для CEP 18, LSI 13 и LSI 21 посчитайте число ядер с 0, 1, 2, 3, 4 или> 4. Посчитайте только ядра с 1 или более FISH-сигналом. Если точность подсчета вызывает сомнения, повторите подсчет в другой области слайда.
- Для CEP X/Y, посчитайте количество ядер с 0,1,2,3,4 и более>4 сигналов (для оранжевого и зеленого сигналов) и запишите количество в двусторонней таблице, и затем подсчитайте процент ядер с X, Y, XY, XX, XXY, XYY, XXX. Подсчитайте только те ядра с одним и более FISH-сигналом другого цвета. Если точность подсчета вызывает сомнения, повторите подсчет в другой области слайда.
- Не подсчитывайте ядра с нечетким сигналом.

Таблица 2 Устранение неполадок

Проблема	Возможные случаи	Пути решения
Сигнал слабый или отсутствует	• Неправильно подобраны фильтры для анализа слайдов • Микроскоп неправильно работает • Использованы несоответствующие лампы (ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте правильные фильтры • Свяжитесь с техническим представителем фирмы-производителя микроскопа • Используйте ртутные лампы (желательно на 100 Вт)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Старая ртутная лампа • Ртутная лампа смещена • Коллекторные линзы загрязнились или треснули • Зеркало в корпусе для лампы загрязнилось или разбито • Ненадлежащие объективы • Не соблюдены условия гибридизации • Неправильные условия промывки • Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, которые затрудняют доступ для зондов • Зонды хранились неправильно	• Замените новую лампу • Откорректируйте лампу • Промойте или замените линзы • Промойте или замените зеркало • Используйте рекомендуемые объективы • Проверьте температуру водяной бани 73±1°C • Проверьте температуру 37±2°C инкубатора • Проверьте температуру водяной бани 73±1°C • Проверьте состав водяной бани (pH, и т.д.) • Покровное стекло должно наноситься сначала путем прикосновения к поверхности гибридизационной смеси • Хранить зонды при температуре -20°C (±5°C) в темноте
Низкая специфичность сигнала	• Не соблюдены условия гибридизации • Температура промывочного раствора низкая	• Проверьте температуру 37±2°C инкубатора • Установите температуру промывочного раствора на 73±1°C
Фоновые помехи на стеклах	• Препараты содержат слишком много цитоплазмы • В клеточных препаратах находится клеточный дебрис • ДНК в образцах недостаточно чистая • Использование широкополосного фильтра, пропускающего много света	• Увеличить время денатурации слайдов до 10 мин. • Промойте клеточный препарат 5 раз свежим фиксатором и повторите процедуру нанесения • Замените промывочный раствор после гибридизации 0.4X SCC промывочным раствором на основе формамида следующим образом: 1. промыть стекла 3 раза в течение 10 мин каждое в растворе 50% формамида/2X SSC, pH 7.5-8.0 при 46±1°C 2. промыть стекла 1X раз в течение 10 минут в 2X SSC при 46±1°C 3. промыть стекла 1X раз в течение 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при 46±1°C • Замените на фильтр с более узкой полосой пропускания или фильтр с несколькими полосами пропускания
	• Неправильные условия промывки или неправильно подготовленные растворы	• Проверьте температуру водяной бани, pH, и/или растворов
	• Слайды недостаточно чистые перед нанесением клеток на них	• Погрузите слайды в этанол и протрите лабораторной салфеткой перед нанесением клеток
Разрушенная морфология хромосом (культивируемые образцы)	• Слайды были высушены достаточно быстро во время подготовки образцов	• Увеличьте относительную влажность во время подготовки образцов слайдов
	• Слайды достаточно свежие до денатурации	• Увеличьте время высушивания образца

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		• Выдержите слайды по крайней мере 24 часа при комнатной температуре до денатурации
	• Слайды недостаточно хорошо высушены для денатурации	• Высушите слайды при температуре 45°C в течении 10 или 15 минут до проведения денатурации
	• Достаточно высокая температура в денатурационной бане	• Проверьте температуру водяной бани
Чрезмерно яркий сигнал	• Концентрация зонда достаточно высокая для вашего микроскопа	• Попытайтесь блокировать некоторые сигналы путем помещения фильтра с нейтральной плотностью на пути возбуждающего луча

Таблица 3. Распределение сигналов для CEP 18, X, и Y (альфа) и LSI 13 и 21 с использованием нормальных мужских слайдов для контроля амниоцитов

	% 0 сигналы	**% 1 сигналы**	**% 2 сигналы**	**% 3 сигналы**	**% 4 сигналы**	**% >4 сигналы**	
CEP 18	0.0-2.0	0.0-2.1	93.0-100	0.0-2.1	0.0-4.0	0.0-1.0	
LSI 13	0.0-2.0	0.0-2.1	93.0-100	0.0-2.1	0.0-5.0	0.0-1.0	
LSI 21	0.0-2.0	0.0-2.1	93.0-100	0.0-2.1	0.0-5.0	0.0-1.0	
	% X	**%Y**	**%XX**	**%XY**	**%XXX**	**%XXY**	**%XXY**
CEP X/Y	0.0-2.0	0.0-2.0	0.0-2.0	93.0-100	0.0-2.0	0.0-2.0	0.0-2.0

Таблица 4. Распределение сигналов для CEP 18, X, и Y (альфа) и LSI 13 и 21 с использованием ProbeChek положительных контрольных слайдов для пренатальной диагностики

	% 0 сигналы	**% 1 сигналы**	**% 2 сигналы**	**% 3 сигналы**	**% 4 сигналы**	**% >4 сигналы**
CEP 18	0.0-1.0	0.0-2.0	0.0-10.0	86.0-100.0	0.0-2.0	0.0-1.0
CEP X	0.0-1.0	0.0-1.0	80.0-100.0	0.0-14.0	0.0-5.0	0.0-1.0
CEP Y	0.0-2.0	96.0-100.0	0.0-3.0	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-1.0
LSI 13	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-5.0	94.0-100.0	0.0-1.0	0.0-1.0
LSI 21	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-2.0	95.0-100.0	0.0-2.0	0.0-1.0

Рисунок 1. Руководство по подсчету одноцветных сигналов (LSI 21 СпектрумОранж: используйте оранжевый одиночный фильтр для подсчета, LSI 13 СпектрумГрин: используйте зеленый одиночный фильтр для подсчета и CEP 18 СпектрумАква: используйте голубой одиночный фильтр для подсчета сигналов

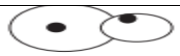
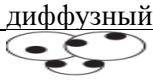
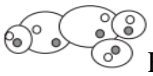
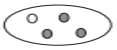
1		Не подсчитывайте, пропустите. Это может быть 2 клетки с одним сигналом в каждой или одно скрученное ядро
2	диффузный	Подсчитывайте как два сигнала: один сигнал достаточно компактный и один
3		Не подсчитывайте, пропустите. Пользователь не может определить, какая клетка содержит сигнал
4		Считать как два сигнала, один сигнал слитный
5		Считать как три сигнала
6		Считать как 4 сигнала
7		Считать как три сигнала. Один сигнал слитный

Рисунок 2. Руководство по подсчету двухцветных сигналов (CEP X СпектрумГрин/CEP Y СпектрумОранж: используйте DAPI/Оранж/Грин фильтр для подсчета сигналов и используйте специфический одиночный для подтверждения.

1	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Не подсчитывать. Ядра перекрываются и все области обеих ядер не видны.
2	Считать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Оранжевый сигнал диффузный.
3	 Не подсчитывать. Ядра находятся слишком близко друг к другу, невозможно определить границы клеток.
4	Считать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Оранжевый сигнал слитный.
5	Считать как один оранжевый и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал слитный и оранжевый сигнал слитный.
6	Считать как два оранжевых и один зеленый сигнал.
7	 Считать как три оранжевых и один зеленый сигналы.
8	Считать как 4 оранжевых сигнала.

Контроль качества

Использование контрольных слайдов - положительный контроль (клеточная линия фибробластов человека) и слайды с отрицательным контролем (нормальные мужские амниоциты человека) должны быть запущены одновременно со слайдами пациентов для мониторинга эффективности анализа и оценки точности подсчета сигналов. Контрольные слайды должны ставится каждый день при проведении FISH исследования и с каждой новой партией лота. Рекомендуются ProbeChek контрольные слайды. Адекватность слайдов и нумерация сигналов должны оцениваться с использованием критериев, описанных выше в разделе подсчет сигналов. Выполнять подсчет сигналов на 50 до 200 ядер. Для CEP 18, LSI 13 и LSI 21, перечисляется количество ядер с 0, 1, 2, 3, 4 или> 4 сигналами. Подсчитывать только те ядра с 1 или более сигналами FISH любого цвета. Для CEP X/Y, перечислите количество ядер с 0, 1, 2, 3, 4 или> 4 сигналами (для обоих как оранжевых, так и зеленых сигналов) и запишите значения в двухстороннюю таблицу, а затем рассчитать процент ядер с X, Y, XY, XX, XXY, XYY, XXX и другие. Снова посчитайте только те ядра с одним или несколькими FISH сигналами любого цвета. Запишите количество ядер с 1, 2, 3, 4 и > 4 сигналами для зонда ДНК CEP или LSI, а затем рассчитать процент ядер с 3 сигналами среди всех клеток с по меньшей мере 1 гибридизованным сигналом. Критерии для соответствия слайдов должны быть убедительны и результаты подсчета сигналов должны быть внутри спецификации, описанной в Таблице 3 и 4 для определения приемлемости выполнения теста.

Если контрольные слайды не соответствуют критериям приемлимости слайдов, анализ не может быть выполнен должным образом или компонент(ы) набора AneuVysion возможно, выполнены неадекватно. Повторите анализ с новыми контрольными слайдами и при необходимости со слайдами образцов пациента. Обратитесь к **Руководству по устранению неисправностей и к Таблице 2** для поиска возможных причин и действий, необходимых для устранения проблем.

Если контрольные слайды соответствуют критериям приемлемости, но значения количества находятся за пределами указанного диапазона, подсчет, возможно, не был выполнен правильно и независимо, повторная оценка того же самого слайда может быть уместна.

Ни в коем случае нельзя выдавать результат FISH-исследования, если контрольные слайды не сработали. Для клинических образцов, когда интерпретация гибридизационных сигналов достаточно сложная и недостаточно образца для повторного анализа, тест будет считаться неинформативным. Если для анализа недостаточно клеток, тест также считается неинформативным.

ИНТЕПРИТАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сообщается о результатах подсчета 50 интерфазных ядер на мишень как количества так и процента ядер с 1, 2, 3, 4 и> 4 сигналами для CEP 18, LSI 13 и LSI 21, а также число и процент ядер с X, Y, XX, XY, XXY, XYY, XXX и др. для CEP X/Y. Наш клиническое исследование показало, что образцы с истинной анеуплоидией, выявленные стандартным хромосомным анализом, показали > 60% анеуплоидных ядер методом FISH-анализа; и те, которые были цитогенетически эуплоидными, все показали <10% анеуплоидных ядер методом FISH-анализа. Значения около 10% так называемый cut-off должны быть

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

интерпретировать с осторожностью, так как низкие уровни мозаицизма не могут быть не учтены. Должны быть выполнены стандартные цитогенетические процедуры, чтобы различать истинный мозаицизм и псевдомозаизм. Пользователь должен проверить эти ожидаемые значения или установить свои собственные.

Расхождения в результатах среди методов исследований могут быть связаны с неточными результатами одного или нескольких методов, различиях в аналитической чувствительности/специфичности, фактические различия в статусе анеуплоидии среди популяций клеток, оцененные различными методами (например, циклические метафазные клетки против нециклических интерфазных клеток) среди других. Повторите FISH (одновременно с материалом QC) и/или повторите стандартный хромосомный анализ с оставшимся образцом, что может быть полезно для оценки возможности получения неверных результатов теста. Если основа для каких-либо расхождений в результатах теста не определяется, или если результаты теста не согласуются с другими клиническими данными, оправдана консультация между цитогенетиком и лечащим врачом.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Набор AneuVysion предназначен только для идентификации целевых областей хромосом X, Y, 18, 13 и 21 в интерфазных ядрах из некультивируемых и культивируемых образцов амниоцитов.
2. Клиническая интерпретация любого результата (ов) теста должна быть сделана в сочетании с другими результатами диагностических лабораторных исследований и должна оцениваться в контексте с историей болезни пациента и текущими факторами риска. Принятие клинического решения должно быть основаны на информации по результатам FISH- исследования и по крайней мере одного из следующих методов: подтверждающий стандартный хромосомный анализ или соответствующая клиническая информация, такое как аномальное ультразвуковое исследование или положительные результаты скринингового теста на синдром Дауна или трисомию 18 хромосомы.
3. Результаты FISH анализа могут быть неинформативными, если качество образца или подготовка слайдов недостаточна.
4. Данный анализ не обнаружит наличие структурных отклонений, часто связаны с врожденными дефектами. Частота этих случаев встречается в популяции и зависит от гестационного возраста.
5. Этот анализ не следует проводить на образцах амниоцитов с умеренным или сильным загрязнением материнскими клетками. Результаты теста FISH на образцах амниоцитов с умеренным загрязнением материнскими клетками должны интерпретироваться с осторожностью.
6. Никакие терапевтические действия не должны начинаться, основываясь только на одном положительном FISH-исследовании. Положительные результаты должны быть далее охарактеризованы с использованием стандартного хромосомного анализа для определения мутационного механизма учета отклонений, детектируемых методом FISH. Эта информация может помочь в консультировании по поводу возможного риска выявленных нарушений, которые могут произойти во время будущей беременности.
7. Врачи, консультанты и другие медицинские работники должны понимать риск отклонений, которые данный тест не предназначен детектировать. Пациенты должны быть информированы, что имеется небольшой риск низкого уровня мозаицизма, зашифрованных транслокаций или других не детектируемых событий, которые не могут быть детектированы методом FISH или методами стандартной цитогенетики. Кроме того, существует маленький риск того, что некоторые индивиды являются носителями генетических полиморфизмов, которые могут повлиять на интенсивность, присутствие или отсутствие сигнала пробы, что в конечном итоге приведет к невозможности постановки диагноза.
8. Когда объем образца не достаточен для удовлетворения минимальных потребностей для постановки как FISH-исследования так и стандартных цитогенетических процедур, пользователь должен внимательно взвесить риски и преимущества использования такого материала для FISH. Консультация между лабораторным генетиком и/или генетическим консультантом и врачом и пациентом может помочь уточнить какая информация требуется и какой метод тестирования может быть использован.
9. Пользователи, выполняющие подсчет сигналов FISH, должны быть способными визуально различать оранжевый, зеленый и голубой сигналы.
10. Хотя зонд на 13 хромосому охватывает локус гена Rb1, эта проба не была валидирована для обнаружения мутаций, ассоциированных с ретинобластомой. В редких случаях локус Rb1 гена может быть детектирован, что может усложнить интерпретацию результатов FISH-исследования.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подсчет количества интерфазного сигнала проводился на образцах эуплоидных и анеуплоидных амниотической жидкости для оценки ожидаемого процента клеток с 0,1,2,3 или >4 сигналов (CEP18, LSI 13 и LSI 21) и с X, Y, XX, XY, XXY, XYY, XXX и другими (CEP X/Y).

Значения среди нормальных образцов амниотической жидкости

Интерфазный FISH- анализ проводился как на культивируемых так и на некультивируемых образцах амниотической жидкости у 504 здоровых доноров (429 некультивируемых и 75 культивируемых), собранных в 31 месте, для определения ожидаемых значений и для верификации точки отсечения. Не было выявлено никакой существенной разницы в распределении сигналов между некультивируемыми и культивируемыми образцами среди этих нормальных случаев. Пятьдесят ядер были подсчитаны на пробу, распределение сигналов для этих объектов представлены в **Таблице 5** и **6**.

Таблица 5. Распределение процента клеток с хромосомой 13, 18 и 21 Сигналы в нормальных образцах амниотической жидкости

		Процент клеток с				
Хромосомная статистика		**0 -сигнал**	**1-сигнал**	**2-сигнал**	**3-сигнал**	**4-сигнал**
13	Значение	0.59	2.71	95.6	0.70	0.04
	S.D.	2.73	3.17	5.17	1.43	0.37
18	Значение	0.38	3.75	94.4	0.99	0.01
	S.D.	1.94	4.01	5.47	1.87	0.20
21	Значение	0.34	2.93	94.6	1.57	0.10
	S.D.	2.06	3.29	5.33	2.18	0.77

Для CEP X/Y-процент клеток с X, Y, XX, XY, XXY, XYY, XXX, и другие категории интересов для оценки ожидаемых значений, среди которых процент клеток с XX у женщин и XY в мужчины являются критическими категориями в цитогенетически нормальных образцах амниотической жидкости. Среднее (± S.D.) процентное содержание клеток со специфическими X/Y сигналами приведены в **Таблице 6.**

Таблица 6. Распределение процента клеток с X и Y сигналами в 376 женских и 445 мужских нормальных образцах амниотической жидкости

Генетическая статистика пола	**X0**	**0Y**	**XX**	**XY**	**XXX**	**XXY**	**XYY**
46, XX	Значение	0.002	96.0	0.02	0.60	0.09	0.00
	S.D.	0.052	4.46	0.24	1.29	0.57	0.00
46, XY	Значение	0.36	0.30	96.9	0.00	0.35	0.39
	S.D.	1.44	1.66	4.39	0.00	1.07	1.23

В цитогенетически нормальных образцах амниотической жидкости процент би-сигнальных и трех-сигнальных клеток это две критические категории для оценки ожидаемых значений для CEP 18, LSI 13 и LSI 21. Среднее (±S.D.) процентное содержание би-сигнальных и трехсигнальных ядер составило 95,60% (±5,17%) и 0,70% (±1,43%) соответственно для хромосомы 13; 94,44% (±5,47%) и 0,99% (±1,87%) соответственно для хромосомы 18; и 94,63% (± 5,33%) и 1,57% (±2,18%), соответственно, для хромосомы 21. Для CEP X/Y процент клеток с ядрами XY у мужчин и XX ядер у женщин являются двумя критическими категориями для оценки ожидаемых значений. Средний (± S.D.) процент клеток с ядрами XY у нормальных мужчин составил 96,91% (±4,39%). Среднее (± S.D.) процентное содержание клеток с XX ядер у нормальных женщин составило 96,01% (±4,46%).

Значения среди анеусомических образцов амниотической жидкости

В цитогенетически аномальных образцах амниотической жидкости, критическими категориями для LSI 13, CEP 18 и LSI 21 - это процент клеток с тремя сигналами (% три-сигнальных ядер). Критическая категория для CEP X/Y это процент клеток с другими сигналами, отличными от ядер XY у мужчин и XX ядер у женщин. Эти критические категории для хромосом 13, 18, 21, X и Y будут называться анеуплоидными клетками.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Была произведена оценка 854 (821 истинных анеуплоидных и 33 триплоидных) анеуплоидных образцов с помощью стандартного хромосомного анализа в главном исследовании. Из этих 854 образцов, 455 были культивированы и 399 не были культивированы. Процент распределения анеуплоидных клеток показал 6 образцов (0,7%) с 63 до 69%, 25 (3,0%) с 70 до 79%, 73 (8,9%) с 80 до 89% и 717 (87,3%) с 90 до 100%. Процент анеуплоидных ядер не был статистически значимым для культивируемых и некультивируемых образцов для всех видов анеусомии. Среднее значение и S.D. % анеуплоидных клеток для этих объектов представлен в **Таблице 7**. для анеуплоидии.

Таблица 7. Средний процент (±S.D.) анеуплоидных клеток при анеуплоидии

% Анеуплоидных клеток			
Анеуплоидия	**n**	**Значение**	**S.D.**
+13	75	91.52	5.91
+18	192	88.87	7.10
+21	322	91.51	7.03
Триплоид - XXY	14	94.64	9.28
Триплоид- XXX	19	93.21	6.15
X	107	96.96	5.11
XXX	44	93.56	7.61
XXY	57	95.84	5.44
XYY	24	94.96	5.51

Верификация точки отсечения

В ключевых исследованиях, опубликованная точка отсечения составила 60%. Среди 504 эуплоидных образцов, большой процент анеуплоидных клеток был на уровне 10% и среди 854 анеуплоидных образцов малый процент анеуплоидных клеток, выявленных FISH-методом, составил 63%. Был отмечен большой разрыв между наибольшим значением среди анеуплоидных образцов и наименьшим значением среди анеуплоидных образцов, уменьшая шанс ошибочной классификации до 60% как точки отсечения.

Значения среди мозаичных образцов амниотической жидкости

В 62 цитогенетически мозаичных образцах амниотической жидкости, процент анеуплоидных клеток, детектируемых методом FISH, варьировал от 2% до 94%. Процент анеуплоидных ядер, выявленных методом FISH и стандартными цитогенетическими методиками, коррелировал (r=0.76), но корреляция была не идеальной. Еще предстоит установить, какое из двух измерений коррелирует лучше с фенотипической экспрессией.

Значения среди псевдомозаичных образцов амниотической жидкости

В 76 цитогенетически псевдомозаичных образцах, процент би-сигнальных ядер по данным FISH-анализа, варьировал от 86% до 100% и процент анеуплоидных клеток варьировал от 0% до 4.8%.

ОСОБЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность и специфичность

Эффективность гибридизации

В проведенных исследованиях**,** среди человеческих образцов амниотической жидкости средний процент клеток без гибридизационного сигнала составил 0.42% для LSI 13, CEP 18, и LSI 21. Средний процент клеток только с одним Y гибридизационным сигналом составил 0.06% для CEP X/Y. Таким образом, <2% клеток без сигнала или только с одним сигналом для каждой пробы является более реалистическим стандартом.

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора AneuVysion была проверена воспроизводимостью результатов испытаний, описанных ниже. В данном исследовании, 100% XY (или 0% X0) образцов были оценены со значением 0.04% (±0.2%) и 10% образцов X были оценены со значением 9.10% (±1.79%). Верхний 95% КН составил 0.43 для 0% 45, образцов и нижний 95% КН для 10% X образцов были 5.59%. Таким образом предел детекции для набора AneuVysion в интерфазных клетках оценивается как 3%.

Аналитическая специфичность

Исследования специфичности локуса проводились на метафазных пластинках, согласно стандартным протоколам контроля качества Abbott Molecular. В общей сложности 705 метафазных пластинок были последовательно изучено методом G-бэндинга для идентификации хромосом 13, 18, 21, X и Y и после этого FISH-методом. Никакой перекрестной гибридизации с другими локусами хромосом в обследуемых 705 клетках не наблюдалось; гибридизация была ограничена таргетными регионами хромосом 13, 18, 21, X и У.

Были проведены также более жесткие исследования, согласно стандартным протоколам контроля качества Abbott Molecular на образцах лимфоцитов и амниоцитов для определения температуры, при которой происходит сбой анализа; определение модели перекрестной гибридизации в более мягких условиях и оценки эффективности гибридизации в нормальных условиях или более жестких условиях. Все анализы, выполненные в пределах рекомендуемого температурного диапазона (т.е. от 72 до 74°C) прошли оценку качества и достигли самого высокого общего рейтинга среди всех испытательных тестов. Некультивируемые образцы амниоцитов показали хорошие результаты в условиях пониженной жесткости и были достигнуты хорошие баллы даже при протекании процесса при температуре 62°C. Перекрестная гибридизация зонда CEP 18 наблюдалась среди культивируемых амниоцитов при низких температурах отмывки, ниже 72°C. Перекрестная гибридизация была подтверждена путем детального анализа изображений, проводимого путем изменения DAPI-связывающих паттернов на метафазах и было отмечено специально на центромерной паре 20 хромосомы, и не на каких-либо других хромосомах или хромосомных парах. Температура отмывки больше 74°C приводила к уменьшению интенсивности сигнала, но специфичность, перекрестная гибридизация и оценка фона остались приемлемыми для достижения целей.

Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости теста AneuVysion, пользователи подсчитывают процент анеуплоидных клеток и также была проведена оценка воспроизводимости для местоположения, между схожими клетками, между днями и между наблюдателями. Один нормальный (46, XY) плюс три культивируемых смеси человеческих амниоцитов с уже заранее известным процентом мозаичности [45,X(10%)/46,XX(90%),45,X(17%)/46,XX(47%)/47, XXX(36%), and 47,XY+21(50%)/46,XY(50%)] были оценены на процент анеуплоидных клеток согласно инструкции для подсчета сигналов, находящейся внутри упаковки. Общий показатель успешной гибридизации составил 85% (102/120) с первой попытки. Гибридизация 18 сменных слайдов (все для одного сайта) была проведена успешно. При использовании ANOVA, никаких статистически значимых изменений не наблюдалось ни в одном из параметров исследования. Среднее значение, стандартное отклонение, и процент CV для наблюдаемого процентного показателя анеуплоидных клеток показаны в **Таблице 8-12.**

Таблица 8. Точность в процентах % анеуплоидных клеток по уровню мозаичности по

Образец	N	Суммарная статистика	%X	%XX	%XXX	%XY	+21	%2-sig CH-21	%2-sig CH-18	%2-sig CH-13
100%, XY	24	Значение	0.04	0.04	0.00	98.88	0.079	96.7	94.60	97.1
		S.D.	0.20	0.20	0.00	1.88	0.79	2.34	3.37	2.35
		C.V (%)	-	-	-	1.9	100	2.4	3.6	2.4
10% X/90% XX	24	Значение	9.10	88.17	0.85	0.00	1.25	94.80	94.90	95.60
		S.D.	1.79	2.88	1.08	0.00	0.97	4.35	4.16	4.14
		C.V (%)	19.7	3.30	-	-	77.6	4.6	4.4	4.3
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	24	Значение	19.48	42.56	36.68	0.00	1.16	96.10	95.70	97.30
		S.D.	4.14	4.88	3.58	0.00	0.98	3.11	3.37	2.09
		C.V (%)	21.3	11.5	9.8	-	84.5	3.2	3.5	2.1
50% XY+21/ 50% XY	24	Значение	0.04	0.00	0.00	98.13	52.03	45.98	96.10	97.10
		S.D.	0.14	0.00	0.00	2.65	4.58	6.82	3.29	2.94
		C.V (%)	-	-	-	2.7	8.8	14.8	3.4	3.0

Таблица 9. Суммарная статистика в % ядер со специфическим сигналом по местоположению

Образец	(n) [a]	Статистика	%X	%XX	%X	%XXX	%+21	%bl-sig 18	%bl-sig 13
100%, XY	1(8)	Значение	99.94	0.00	0.00	0.00	0.75	99.00	99.00
		S.D.	0.18	0.00	0.00	0.00	0.80	1.34	1.31
		C.V (%)	0.2	-	-	-	-	1.4	1.3
		Значение	95.56	0.00	0.00	0.00	1.92	93.15	95.57
		S.D.	1.68	0.00	0.00	0.00	0.96	2.22	2.49
		C.V (%)	1.8	-	-	-	50.0	2.4	2.6

	2(8)								
	3(8)	Значение	99.94	0.00	0.00	0.00	0.00	98.56	99.38
		S.D.	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	1.29	1.41
		C.V (%)	0.2	-	-	-	-	1.3	1.4
10% X/90% XX	1(8)	Значение	0.00	87.19	11.88	0.94	0.50	98.88	98.94
		S.D.	0.00	1.49	1.71	0.86	0.60	0.74	0.78
		C.V (%)	-	1.7	14.4	91.5	-	0.7	0.8
	2(8)	Значение	0.00	86.20	7.37	2.56	2.49	89.95	90.28
		S.D.	0.00	1.95	1.36	1.82	1.46	3.01	2.20
		C.V (%)	-	2.3	18.5	71.1	58.6	3.3	2.4
	3(8)	Значение	0.00	89.78	10.16	0.06	0.00	98.63	99.31
		S.D.	0.00	1.08	0.98	0.18	0.00	0.52	0.65
		C.V (%)	-	1.2	9.6	-	-	0.5	0.7
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	1(8)	Значение	0.00	46.10	17.28	36.63	0.50	98.13	98.69
		S.D.	0.00	3.03	1.38	2.09	0.53	1.60	1.19
		C.V (%)	-	6.6	8.0	5.7	-	1.6	1.2
	2(8)	Значение	0.00	43.03	18.89	34.34	1.81	91.94	93.65
		S.D.	0.00	5.04	3.49	5.42	1.07	1.45	2.18
		C.V (%)	-	11.7	18.5	15.8	59.1	1.6	2.3
	3(8)	Значение	0.00	47.75	17.25	35.00	0.00	98.69	99.25
		S.D.	0.00	2.10	2.04	1.75	0.00	1.13	0.96
		C.V (%)	-	4.4	11.8	5.0	-	1.1	1.0
50% XY+21/ 50% XY	1(8)	Значение	100	0.00	0.00	0.00	48.81	99.25	98.94
		S.D.	0.00	0.00	0.00	0.00	1.07	0.46	0.82
		C.V (%)	-	-	-	-	2.2	0.5	0.8
	2(8)	Значение	93.01	0.00	0.44	0.00	59.08	92.94	96.08
		S.D.	2.17	0.00	0.49	0.00	6.76	1.63	1.68
		C.V (%)	2.3	-	-	-	11.4	1.8	1.7
	3(8)	Значение	100.0	0.00	0.00	0.00	52.81	98.88	99.94
		S.D.	0.00	0.00	0.00	0.00	3.14	1.43	0.18
		C.V (%)	-	-	-	-	5.9	1.4	0.2

Таблица 10. Суммарная статистика в % ядер со специфическим сигналом по зондам

Образец	**Lot (n)[a]**	**Статистика**	**%XY**	**%XX**	**%X**	**%XXX**	**%+21**	**%bl-sig 18**	**%bl-sig 13**
100%, XY	6618(6)	Значение	98.59	0.00	0.00	0.00	0.58	91.10	97.00
		S.D.	2.03	0.00	0.00	0.00	0.74	2.82	2.70
		C.V (%)	2.1	-	-	-	-	2.9	2.8
	6619(6)	Значение	98.33	0.00	0.00	0.00	0.83	97.08	98.75
		S.D.	2.41	0.00	0.00	0.00	1.12	3.04	2.10
		C.V (%)	2.5	-	-	-	-	3.1	2.1
	6620 (6)	Значение	98.42	0.00	0.00	0.00	1.32	96.68	98.09
		S.D.	3.01	0.00	0.00	0.00	1.27	4.11	2.49
		C.V (%)	3.1	-	-	-	96.2	4.3	2.5
	6621 (6)	Значение	98.58	0.00	0.00	0.00	0.83	96.76	98.09
		S.D.	2.33	0.00	0.00	0.00	1.20	3.40	2.85
		C.V (%)	2.4	-	-	-	-	3.5	2.9
10% X/90% XX	6618(6)	Значение	0.00	87.19	11.88	0.94	0.50	98.88	98.94
		S.D.	0.00	1.49	1.71	0.86	0.60	0.74	0.78
		C.V (%)	-	1.7	14.4	91.5	-	0.7	0.8

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	6619(6)	Значение	0.00	86.20	7.37	2.56	2.49	89.95	90.28
		S.D.	0.00	1.95	1.36	1.82	1.46	3.01	2.20
		C.V (%)	-	2.3	18.5	71.1	58.6	3.3	2.4
	6620(6)	Значение	0.00	89.78	10.16	0.06	0.00	98.63	99.31
		S.D.	0.00	1.08	0.98	0.18	0.00	0.52	0.65
		C.V (%)	-	1.2	9.6	-	-	0.5	0.7
	6621(6)	Значение	0.00	88.42	9.33	1.59	0.91	96.67	96.35
		S.D.	0.00	2.31	3.28	2.29	1.62	3.04	4.22
		C.V (%)	-	2.6	35.2	-	-	3.1	4.4
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	6618(6)	Значение	0.00	46.10	17.28	36.63	0.50	98.13	98.69
		S.D.	0.00	3.03	1.38	2.09	0.53	1.60	1.19
		C.V (%)	-	6.6	8.0	5.7	-	1.6	1.2
	6619(6)	Значение	0.00	43.03	18.89	34.34	1.81	91.94	93.65
		S.D.	0.00	5.04	3.49	5.42	1.07	1.45	2.18
		C.V (%)	-	11.7	18.5	15.8	59.1	1.6	2.3
	6620(6)	Значение	0.00	47.75	17.25	35.00	0.00	98.69	99.25
		S.D.	0.00	2.10	2.04	1.75	0.00	1.13	0.96
		C.V (%)	-	4.4	11.8	5.0	-	1.1	1.0
	6621(6)	Значение	0.00	47.92	19.05	31.78	0.58	96.42	97.01
		S.D.	0.00	2.91	2.04	4.58	0.97	3.99	2.91
		C.V (%)	-	6.1	10.7	14.4	-	4.1	3.0
50% XY+21/ 50% XY	6618(6)	Значение	97.83	0.00	0.17	0.00	55.28	96.76	98.18
		S.D.	3.86	0.00	0.26	0.00	6.30	3.72	1.95
		C.V (%)	3.9	-	-	-	11.4	3.8	2.0
	6619(6)	Значение	97.76	0.00	0.33	0.00	51.48	97.08	97.92
		S.D.	3.51	0.00	0.60	0.00	6.10	3.60	2.29
		C.V (%)	3.6	-	-	-	11.8	3.7	2.3
	6620(6)	Значение	97.76	0.00	0.00	0.00	54.31	97.08	98.83
		S.D.	3.56	0.00	0.00	0.00	7.98	3.61	1.75
		C.V (%)	3.6	-	-	-	14.7	3.7	1.8
	6621(6)	Значение	97.33	0.00	0.08	0.00	53.21	97.17	98.34
		S.D.	4.32	0.00	0.20	0.00	3.87	2.66	2.27
		C.V (%)	4.4	-	-	-	7.3	2.7	2.3

Таблица 11. Суммарная статистика в % ядер со специфическим сигналом по дням исследования

Образец	**День (n)[a]**	**Статистика**	**%XY**	**%XX**	**%X**	**%XXX**	**%+21**	**%bl-sig 18**	**%bl-sig 13**
100%, XY	1(6)	Значение	98.42	0.00	0.00	0.00	1.08	96.42	97.59
		S.D.	2.22	0.00	0.00	0.00	1.27	3.10	2.91
		C.V (%)	2.3	-	-	-	-	3.2	3.0
	2(6)	Значение	98.42	0.00	0.00	0.00	0.91	96.56	97.59
		S.D.	3.01	0.00	0.00	0.00	1.37	3.88	2.57
		C.V (%)	3.1	-	-	-	-	4.0	2.6
	3(6)	Значение	98.67	0.00	0.00	0.00	1.00	97.76	98.33
			2.08	0.00	0.00	0.00	0.77	3.28	2.89

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		S.D.	2.1	-	-	-	77.0	3.4	2.9
		C.V (%)							
	4 (6)	Значение	98.41	0.00	0.00	0.00	0.58	96.83	98.41
			2.46	0.00	0.00	0.00	0.97	3.01	1.94
		S.D.	2.5	-	-	-	-	3.1	2.0
		C.V (%)							
10% X/90% XX	1(6)	Значение	0.00	87.60	9.91	1.25	1.16	94.92	96.17
		S.D.	0.00	1.86	1.54	1.21	1.35	6.05	4.59
		C.V (%)	-	2.1	15.5	96.8	-	6.4	4.8
	2(6)	Значение	0.00	88.33	9.33	1.67	1.16	96.92	96.26
			0.00	1.99	2.99	2.27	1.56	3.31	4.16
		S.D.	-	2.3	32.0	-	-	3.4	4.3
		C.V (%)							
	3(6)	Значение	0.00	87.50	10.17	1.00	0.50	95.26	95.77
			0.00	3.00	2.34	1.51	0.77	5.30	5.11
		S.D.	-	3.4	23.0	-	-	5.6	5.3
		C.V (%)							
	4 (6)	Значение	0.00	87.45	9.80	0.83	1.17	96.17	96.51
			0.00	2.00	2.70	1.21	1.94	4.23	5.19
		S.D.	-	2.3	27.6	-	-	4.4	5.4
		C.V (%)							
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	1(6)	Значение	0.00	45.28	17.63	35.77	0.66	96.50	95.84
			0.00	5.65	3.06	2.84	0.98	4.36	3.89
		S.D.	-	12.5	17.4	7.9	-	4.5	4.1
		C.V (%)							
	2(6)	Значение	0.00	45.88	17.29	36.09	1.00	96.42	97.43
			0.00	4.02	2.40	1.93	1.45	2.80	2.86
		S.D.	-	8.8	13.9	5.3	-	2.9	2.9
		C.V (%)							
	3(6)	Значение	0.00	45.22	19.57	33.97	0.91	95.75	97.59
			0.00	3.17	1.96	1.75	0.00	1.13	0.96
		S.D.	-	7.0	10.0	16.8	-	3.8	3.2
		C.V (%)							
	4 (6)	Значение	0.00	46.13	16.74	35.47	0.50	96.33	97.93
			0.00	3.77	2.01	2.87	0.77	3.56	2.12
		S.D.	-	8.2	12.0	8.1	-	3.7	2.2
		C.V (%)							
50% XY+21/ 50% XY	1(6)	Значение	97.76	0.00	0.00	0.00	55.14	96.83	98.75
			3.56	0.00	0.00	0.00	7.26	3.44	1.75
		S.D.	3.6	-	-	-	13.2	3.6	1.8
		C.V (%)							
	2(6)	Значение	97.83	0.00	0.17	0.00	53.54	96.92	98.01
			3.86	0.00	0.26	0.00	7.32	3.84	1.96
		S.D.	3.9	-	-	-	13.7	4.0	2.0
		C.V (%)							
	3(6)	Значение	97.76	0.00	0.33	0.00	52.89	97.00	98.09
			3.51	0.00	0.60	0.00	5.98	3.51	2.29
		S.D.	3.6	-	-	-	11.3	3.6	2.3
		C.V (%)							
	4(6)	Значение	97.33	0.00	0.08	0.00	52.79	97.33	98.42
			4.32	0.00	0.20	0.00	4.34	2.80	2.29
		S.D.	4.4	-	-	-	8.2	2.9	2.3
		C.V (%)							

Таблица 12. Суммарная статистика в % специфически-сигнальных ядер сделанная наблюдателями

Образец	**N**	**Суммарная**	**%X**	**%XX**	**%XXX**	**%XY**	**+21**	**%2-sig**	**%2-sig CH-18**	**%2-sig**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		статистика						CH-21		CH-13
100%, XY	1 (12)	Значение	0.04	0.04	0.00	98.88	0.079	96.7	94.60	97.1
		S.D.	0.20	0.20	0.00	1.88	0.79	2.34	3.37	2.35
		C.V (%)	-	-	-	1.9	100	2.4	3.6	2.4
10% X/90% XX	24	Значение	9.10	88.17	0.85	0.00	1.25	94.80	94.90	95.60
		S.D.	1.79	2.88	1.08	0.00	0.97	4.35	4.16	4.14
		C.V (%)	19.7	3.30	-	-	77.6	4.6	4.4	4.3
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	24	Значение	19.48	42.56	36.68	0.00	1.16	96.10	95.70	97.30
		S.D.	4.14	4.88	3.58	0.00	0.98	3.11	3.37	2.09
		C.V (%)	21.3	11.5	9.8	-	84.5	3.2	3.5	2.1
50% XY+21/ 50% XY	24	Значение	0.04	0.00	0.00	98.13	52.03	45.98	96.10	97.10
		S.D.	0.14	0.00	0.00	2.65	4.58	6.82	3.29	2.94
		C.V (%)	-	-	-	2.7	8.8	14.8	3.4	3.0

Сравнение методов: Клинические образцы

Было проведено мульти центровое, контролируемое сравнительное исследование для дальнейшего определения характеристик набора AneuVysion относительно стандартного хромосомного анализа, стандарты осмотрительности в культивируемых и некультивируемых образцах амниотической жидкости. Было проведено 31 обследование на месте образцов амниотической жидкости, полученных у 1561 пациента с одним или более факторов риска, перечисленных ниже:

1. Возраст матери: 978 образцов
2. Плохие результаты ультразвукового исследования: 751 образец
3. Плохие результаты скрининга: 591 образец
4. Семейный анамнез: 78 образцов
5. Повышенный уровень альфа-фетопротеина в сыворотке у матери: 72 образца
6. Желание самой матери: 15 образцов
7. Другое: 75 образцов.

Все исследовательские центры проводили исследования в соответствии с предписанным анализом процедуры и руководству по подсчету сигналов.

Всего было получено и проанализировано 2238 образцов амниоцитов, выделенных и проанализированных у 1516 пациентов. Из 2 238 образцов 55 считались неинформативными. Эти 55 неинформативных образца включали три, которые были контаминированы материнскими клетками, 4 после неудачных попыток FISH-исследования и у 48 было недостаточно (<40) ядер для анализа. Т.о. на основе выборки показатель информативности составил 97,5% (2183/2238). Отмечено, что среди 48 неинформативных случаев из-за недостаточного (<40) количества ядер, полученных для одной или двух проб, 31 были частично не информативны либо для CEP 18/X/Y (22) или для LSI 13/21 (9).

Из 1516 пациентов 13 пациентов с как с некультивируемыми так и с культивируемыми образцами были включены в 55 неинформативных образцов. Таким образом показатель информативности на каждого пациента коэффициент информативности составил 99.8% (1503/1516). Один образец на пациента был включен в первичный анализ. Из них, 598 были культивируемыми и 927 были некультивируемыми образцами. **Таблица 13** обобщает исследование образцов по кариотипу и типу образцов.

Таблица 13 Характеристика образцов по типу анеуплоидии

Анеуплоидия	Культивируемые	Прямой	Общий
Норма	76	435	511
+13	34	41	75
+18	107	87	194
+21	156	167	323
-21	0	1	1
Триплоид	12	21	33
Тетраплоид	1	0	1
X	54	54	108

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

XXX	31	15	46
XXY	45	12	57
XXXXY	1	0	1
XXY, +18	1	0	1
XXX, +18	0	1	1
XXYY	1	0	1
XYY	17	7	24
45, XX, idic(18)	0	1	1
Псевдомозаицизм	14	62	76
Мозаицизм	39	23	62
Общее кол-во	**589**	**927**	**1516**

Возраст матери варьировал от 13 до 52 года, со средним возрастным значением (±S.D) 33.2 года (±6.8 лет). Гестационный возраст варьировал от 11 до 38 недель, со средним значением (±S.D.) 18,8 недель (±4.6 недели). Значения материнского возраста варьировал в зависимости от места исследования, в то время как значения гестационного возраста нет.

Сравнение результатов FISH-анализа и стандартного хромосомного анализа.

Каждый шаг FISH-анализа был выполнен в соответствии с инструкциями к набору AneuVysion, находящемуся внутри упаковки. Процент анеуплоидных клеток был определен методом FISH после подсчета минимум 50 интерфазных ядер на мишень, при этом минимум 40 оцениваемых ядер должны считаться информативными.

Из этого основного мульти центрового исследования, описанного выше, результаты интерфазного FISH-анализа сравнили со стандартным хромосомным анализом, представленным в **Таблице 14.**

Таблица 14 % анеуплоидных клеток, полученных методом FISH, категории стандартного хромосомного анализа. Все участки объединены и все образцы информативны для обоих проб.

% Анеуплоидных клеток		**Стандартный цитогенетический хромосомный анализ**				
		Анеуплоидия [a]	**Мозаицизм [b]**	**Псевомозаицизм[c]**	**Эуплоидия**	**Общее кол-во**
FISH	>60%	860[d]	15[e]			875
	10-60%	1[f]	35			36
	<10%		12[g]	76	504[h]	592
	Неудачный анализ	6			7	13
	Общее кол-во	**867**	**62**	**76**	**511**	**1516**

[a] Включает 75 +13; 192+ 18;322 +21; 107 45,X; 44 47,XXX; 57 47, XXY, 24 47, XYY; один -21; один XXY +18; один XXX +18; один 49,XXXXY, один 48,XXYY; один тетраплоид 92,XXYY и 33 триплоида (19 69, XXX и 14 69, XXY).

[b] Включено 23 случая, ассоциированных с 45, X, 10 с XXX, 8 с XXY, 7 с +21, 4 с +18, 2 с -18, 3 с +13 и 5 с 45,X комплекса.

[c] Включено 7 +13, 9 -13, один +18, 24 -18, 11 +21, 19 -21, 25 XO, один XXX, один XXY, один XYY и 6 XXYY

[d] Включено один случай 47,XX, +21 и один случай 47,XY, +21 с небольшой контаминацией материнскими клетками.

[e] В 8 случаях из 15, стандартный цитогенетический анализ показал что % анеуплоидных метафаз ≥60%.

[f] Один случай с 46,XX, idic (18), результат FISH был на уровне 35% +18 и 96% XX в некультивируемых образцах. FISH анализ культивируемого образца этого же образца показал 100% для обоих +18 и XX.

[g] В 7 из 12 случаев, стандартный цитогенетический анализ также показал % процент анеуплоидных метафаз ≤ 10%.

[h] Включен один случай 47,XY+22 и три случая 46,XY с незначительной контаминацией материнскими клетками.

Истинные случаи анеуплоидии

Среди 861 случаев анеуплоидии, были 75 +13; 192 +18; 322 +21; 107 45,X; 44 47, XXX; 57 47,XXY; 24 47,XXY; один -21; один XXY +18; один XXX +18; один 49,XXXXY; один 48, XXYY; один тетраплоид 92,XXYY и 33 трипоида (19 69,XXX и 14 69, XXY) и один 46,XX, idic(18). Из которых 860 с процентом анеуплоидных клеток, выявленных методом FISH больше 60% и один 35% - из-за длительного хранения приготовленного слайда. Т.о. при самом плохом сценарии, для детекции истинной анеуплоидии, методом FISH можно выявить 99,9% (860/861) случаев, выявляемых стандартным хромосомным анализом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Следует также отметить, что один случай женский и один мужской трисомии 21 хромосомы с незначительным загрязнением материнскими клетками считались информативными.

Случаи мозаицизма

Было выявлено 62 случая истинного мозаицизма, выявляемого стандартным хромосомным анализом. Из них было 23 случая, ассоциированных с 45,X, 10 с XXX, 8 с XXY, 7 с +21, 4 с +18, 2 с -18, 3 с +13 и 5 с XO. Даже несмотря на то, что клеточные линии анеуплоидных клеток были выявлены в 60 случаях, 12 из 62 случаев мозаицизма показали менее чем 10% анеуплоидных клеток методом FISH и 15 показали больше, чем 60%. Процент корреляции между методом FISH и стандартным хромосомным анализом составил 0.76.

Случаи псевдомозаицизма

Всего было выявлено 76 случаев псевдомозаицизма методом стандартного хромосомного анализа. Среди этих 76 случаев, наблюдалось 7+13, 9-13, один +18, 24-18, 11 +21, 19 -21, 25 XO, один XXY, один XYY и шесть XXYY. Результаты FISH анализа показали менее чем 10% анеуплоидных клеток, что согласуется с эуплоидным состоянием.

Эуплоидные случаи

Среди 504 эуплоидных случаев, выявляемых методом стандартного хромосомного анализа, методом FISH выявлено менее 10% анеуплоидных клеток. Т.о. для определения эуплоидии, методом FISH можно детектировать 100% (504/504) случаев, детектируемых стандартным хромосомным анализом. Обратите также внимание, что все 4 мужских эмбриона с незначительным заражением материнскими клетками считались информативными.

Попарное сравнение между культивируемыми и некультивируемыми образцами

Всего в исследование было включено 722 пациента, которым был проведен FISH-анализ как на культивируемых так и на некультивируемых образцах. Сравнительный анализ результатов исследования 722 культивируемых и некультивируемых образцов представлен в **Таблице 15.** В случаях мозаицизма**,** анеуплоидные линии клеток, детектируемые методом FISH, с различным процентом анеуплоидных клеток, между культивируемыми и некультивируемыми образцами. Результаты FISH-анализа при анеуплоидии, эуплоидии и в случаях пседомозаицизма совпадали в случаях между культивируемыми и некультивируемыми образцами.

Таблица 15 Сравнение результатов анализа на культивируемых и некультивируемых образцах одного и того же образца

	Некультивируемые					
Культивируемые	**Анеуплоидия**	**Мозаицизм**	**Псевдомозаицизм**	**Эуплоидия**	**Ошибки**	**Общее кол-во**
Анеуплоидия	299	2[d]			19	320
Мозаицизм	1[d]	9		1[d]		11
Псевдомозаицизм			54		9	63
Эуплоидия	1[d]			313	11	325
Ошибки						
Общее кол-во		1	1	1		3

[a] Включено 27 +13; 66 +18; 147 +21; 25 45,X; 10 47,XXX; 4 47,XYY; 4 47,XYY; 9 триплоид; один 46,XX, idic(18); один 46,XX, -21, +mar, der (21) (wcp21+).

[b] Включено 5 45,X; 2,XXY; один XXX; один +13; один +21; и один -18. Даже если были обнаружены все линии анеуплоидных клеток, % анеуплоидных клеток варьировал.

[c] У 42 пациентов были как культивируемые так и некультивируемые пары образцов, в которых 19 были с анеуплоидией, 10 с псевдомазаицизмом, 12 с эуплоидией и 1 с мозаицизмом.

[d] Хотя были обнаружены как анеуплоидные и/или эуплоидные линии клеток методом FISH-анализа, % анеуплоидных клеток варьировал между культивируемыми и некультивируемыми образцами.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. American College of Medical Genetics. Technical and clinical assessment of fluorescence in situ hybridization: an ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations. Genet Med. 2000; 2(6):356-361.

2. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. Br Med J. 1988; 297:883-887.

3. Canick JA, Palomaki GE, Osthanondh R. Prenatal screening for trisomy 18 in the second trimester. Prenat Diagn. 1990; 10:546-548.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Ried T, Landes G, Dackowski W, et al. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. Hum Mol Genet. 1992;1:307-313.
5. Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. Am J Hum Genet. 1993;52:854-865.
6. Robinson A, Puck M, Pennington B, et al. Abnormalities of the sex chromosomes: a prospective study on randomly identified newborns. Birth Defects. 1979;15:203-241.
7. West JD, Gosden CM, Gosden JR, et al. Sexing the human fetus and identification of polyploid nuclei by DNA-DNA in situ hybridization in interphase nuclei. Mol Reprod Dev.1989;1:129-137.
8. Cacheux V, Tachdjian G, Druart L, et al. Evaluation of X, Y, 18, and 13/21 alpha satellite DNA probes for interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Prenat Diagn. 1994;14:79-86.
9. Romana SP, Tachdjian G, Druart L, et al. A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes. Eur J Hum Genet. 1993;1:245-251.
10. Zheng YL, Ferguson-Smith MA, Warner JP, et al. Analysis of chromosome 21 copy number in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization using a cosmid contig. Prenat Diagn. 1992;12:931-943.
11. Lebo RV, Flandermeyer RR, Diukman R, et al. Prenatal diagnosis with repetitive in situ hybridization probes. Am J Med Genet. 1992; 43:848-854.
12. Zahed L, Murer-Orlando M, Vekemans M. In situ hybridizations studies for the detection of common aneuploidies in CVS. Prenat Diagn1992; 12:483-493.
13. Christensen B, Bryndorf T, Philip J, et al. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive in situ hybridization. Prenat Diagn. 1992;12:241-250
14. Gersen SL, Carelli MP, Ward BE. A retrospective statistical study of 4,500 prenatal FISH analyses: trisomic vs. disomic cutoff thresholds for autosomal aneuploidies. Am J Hum Genet Suppl. 1993;53:A1411.
15. Ward BE, Wright M, Lytle C, et al. Prenatal aneuploidy detection by fluorescence in situ hybridization (FISH) in 1,068 second trimester pregnancies with fetal ultrasound abnormalities. Am J Hum Genet Suppl. 1994;55:A1696.
16. Kuo W-L, Tenjin H, Segraves R, et al. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13,18, or 21 by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. Am J Hum Genet. 1991;49:112-119.
17. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): two-year multi-center retrospective study and review of the literature. Prenat Diagn. 2001;21(4):293-301.
18. U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987;36 (suppl. 2S):2S-18S.
19. Barch MJ, ed. The ACT Cytogenetics Laboratory Manual. 2nd ed. New York, NY: Raven Press, Ltd; 1991:17-105, 297-536.
20. Winsor EJT, Silver MP, Theve R, et al. Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. Prenat Diagn. 1996;16:49-54.
21. Hsu LYF, Kaffe S, Jenkins EC, et al. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. Prenat Diagn. 1992;12:555-573.
22. ACOG Practice Bulletin No. 88: Invasive Prenatal Testing for Aneuploidy. Obstet Gynecol. 2007;110(6):1459-67.
23. Cunniff C, et al. Prenatal screening and diagnosis for pediatricians. Pediatrics. 2004;114(3):889-94.
24. Hong Kong College of Obstetricians and Gynaecologists. Guidelines for genetic amniocentesis. HKCOG Guidelines [serial online]. July 2000;4:1-4. Available at: http://www.hkcog.org.hk/docs/guidelines/Genetic%20Amniocentesis_2000.pdf. Accessed April 19, 2010.
25. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
26. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
28. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефонам (1-800-553-7042) (в США) +49-6122-580 (другие регионы) или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

AneuVysion, Vysis, LSI, СпектрумАква, СпектрумГрин, СпектрумОранж, и ProbeCheck– торговые марки группы компании Abbott

AneuVysion и другие ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты 5,663,319 и 5,491,224. Vysis LSI, CEP WCP меченые флуорохромами ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты RE40, 494, 6,596,479, 5,756,696, 7, 115,709 и 6,203,977 даны исключительно на продукцию Abbott Molecular Inc Калифорнийским Университетом. Методы детекции гибридизационных сигналов одновременно защищены патентами США. Патент 6,203,977 даны на продукцию Abbott Molecular Inc., Йельским университетом.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

CE

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

°2006, 2020 Abbott Laboratories

www. abbottmolecular.com
Март 2020
30-608368/R6

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit

en

REF 07J20-008
07J22-008

30-608315/R7

CEP 8 SpectrumOrange
DNA Probe Kit
REF 07J20-008; 07J22-008
30-608315/R7

Изменения выделены

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Предназначен для выполнения <n>тестов
	Температурные ограничения
	Опасность
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Опасность
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

CEP 8 SpectrumOrange проба прямого мечения для подсчета хромосом при проведении флуоресцентной гибридизации in situ.
(Номер партии 30-160008, Кат. номер 07J20-008;
Номер партии 32-160008, кат. номер 07J22-008).

НАИМЕНОВАНИЕ

CEP 8 SpectrumOrange ДНК-проба прямого мечения.

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ

Реагенты для проведения флуоресцентной гибридизации in situ.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор CEP 8 SpectrumOrange ДНК-проба прямого мечения предназначена для обнаружения богатых АТ альфа-саттелитных сиквенсовых последовательностей в центромерном регионе хромосомы 8 в сочетании с рутинными диагностическим цитогенетическим тестированием. Как указано, пробу

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

можно использовать в качестве дополнения к стандартному цитогенетическому анализу для подсчета 8 хромосомы с помощью метода флуоресцентной гибридизации in situ в интерфазных и метафазных ядрах, выделенных из костного мозга у пациентов с миелоидными заболеваниями [хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), Миелопролиферативные расстройства (МПР) и миелодиспластический синдром (МДС), и гематологический расстройства. Проба не предназначена для автономного анализа для отчетов об испытаниях. Не предназначена для использования в материалах после длительного культивирования клеток, таких как амниоциты, фибробласты, опухолевые клетки.

ОБЪЯСНЕНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Были широко изучены хромосомные абберации при миелоидных заболеваниях, при этих расстройствах возникает различное множество хромосомных аномалий. Примерно 18% всех миелоидных заболеваний связано с трисомией 8 хромосомы.[1] ХМЛ составляет 15% лейкозов у взрослых. Средний возраст начала болезни 67 лет, однако ХМЛ встречается во всех возрастных группах (См. статистику). В 2012 году примерно 4 870 случаев диагностировано в США и 440 пациентов умерло от болезни.[16] ХМЛ является клональным заболеванием костного избыточным неопластическим производством гранулоцитов. Заболевание характеризуется двумя главными фазами: начальная хроническая фаза и фаза кризиса терминального взрыва. Переход от хронической к взрывной фазе часто сопровождается 1 или более 3 специфических хромосомных аномалий: трисомия 8 хромосомы, дополнительная Филадельфийская хромосома или изохромосома 17q. Эти отклонения часто предшествуют фазе клинического взрыва, от 2 до 6 месяцев. Трисомия 8 хромосомы присутствует примерно в 20-50% аномальных случаев.[2-4]

МПР представляет собой группу хронических, клональных, неопластических заболеваний, характеризующимся чрезмерной пролиферацией одной и более линий миелоидного ряда. Созревание страдает как правило в меньшей степени, задержка созревания отсутствует. Основные подтипы МПР: истинная полицетимия, идеопатический миелофиброз (ИМФ), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и ХМЛ, который обычно распознается как отдельная субъедница и описана выше. Различные подтипы МПР отличаются по типу кроветворных клеток, которые преимущественно при этом затронуты. Все миелолимфопролиферативные заболевания имеют тенденцию прогрессировать до острого нелимфоцитарного лейкоза. Хотя и специфические кариотипические аномалии для МПР отсутствуют, определенные хромосомы участвуют преимущественно в численных и структурных аномалиях. Наиболее частые хромосомные перестройки затрагивают длинное плечо 1 хромосомы, это также моносомия 7 хромосомы, трисомия 8 хромосомы, делеция 13q и 20q. Трисомия 8 хромосомы составляет примерно 20% от всех хромосомных перестроек в случаях с полицетемией и обычно возникают при трисомии 9 хромосомы.[5,6] Среди хромосомных аномалий в случаях с идеопатическим миелофиброзом, трисомия 8 хромосомы присутствует в 10% случаев[4]. Миелодиспластический синдром – это группа плохо определяемых расстройств, в основном затрагивающем пожилых людей, при которых нарушении функции костного мозга обусловлено как качественными так количественными дефектами кроветворных клеток. МС представляют собой миелоидные клональные гомеопатии с относительно гетерогенным спектром проявления.

Основными клиническими проблемами при этих расстройствах являются заболевания, вызванные цитопенией пациентов и потенциалом для превращения МДЛ в острый миелоидный лейкоз. Среди населения в целом острый МДС встречается у 5 человек на 100.000 населения. Тем не менее среди лиц старше 70 лет, заболеваемость увеличивается между 22 и 45 на 100 000 населения и еще больше увеличивается с возрастом.[17] Наиболее важной морфологической особенностью костного мозга при МДС является нарушение в дифференцировке и пролиферации всех клеточных линий. Пациенты проявляют периферическую цитопению несмотря на нормоцеллюлярность или гиперцеллюлярность костного мозга. Неслучайные хромосомные абберации наблюдались у 79% пациентов с последовательным кариотипом МДС. Наиболее частные абберации – делеция 5q, моносомия 7 и трисомия 8 хромосом.[4] Трисомия 8 хромосомы встречается примерно в 10-20% случаев.[4,7,8]

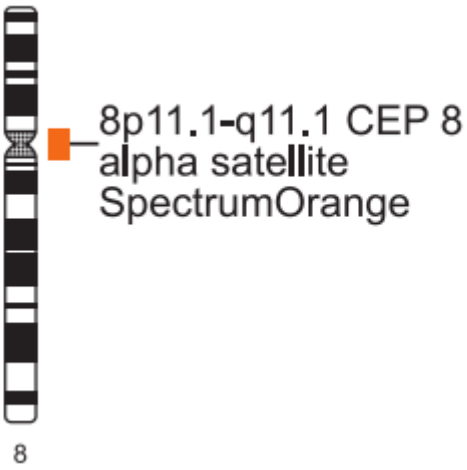
Острый нелимфоцитарный лейкоз – наиболее распространённая форма лейкимии у взрослых, поражающая примерно 2,5 человека на 100 000 населения. Выдающейся патологической особенностью ОНЛ является чрезмерное накопление незрелых нелимфоцитарных клеток-предшественников костного мозга в самом костном мозге, в периферической крови, а иногда в других тканях. Постулируемый блок при созревании клеток-предшественников предотвращает дальнейшее

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

прохождение миелоидных клеток вниз по 1 и более 4 из основных путей дифференцировки. Более чем 25 цитогенетических аномалий были связаны с ОНЛ, 80% пациентов с ОНЛ имеют хотя бы один из них. Этот вывод предполагает, что болезнь является результатом безудержного распространения одного клона, происходящего из одной генетически измененной клетки. Трисомия 8 хромосомы является наиболее частой абберацией при ОНЛ, встречается как одиночное изменение в 7% всех хромосомно- аномальных случаев и в 15% всех атипичных случаев.[2,4,9]

ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

Гибридизация in situ – это метод, позволяющий визуализировать конкретные последовательности нуклеиновых кислот в клеточной популяции. В частности, FISH включает точный отжиг одноцепочечного флуоресцентно-меченого ДНК-зонда, комплементарного целевой последовательности. Гибридизация зонда с клеточной ДНК видна при прямом обнаружении с помощью флуоресцентной микроскопии. Ткань, состоящая из интерфазных ядер или метафазных ядер, наносится на предметные стекла с использованием стандартных цитогенетических методик. В результате полученная ДНК образца денатурируется до одноцепочечной формы и затем гибридизутся с зондом ДНК CEP 8. Далее происходит гибридизация и несвязанный зонд удаляется путем серии промывок, хромосомы и ядра прокрашиваются специфическим красителем DAPI, который флуоресцирует синим цветом. Гибридизация зонда CEP 8 визуализируется с использованием флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссии, позволяющих визуализировать как интенсивный оранжевый сигнал, сосредоточенный в центромере 8 хромосомы и голубой сигнал, окрашиваемый ядра и хромосомы. Подсчет 8 хромосомы проводится микроскопически, по интерфазным и метафазным ядрам. Флуоресцентно окрашенные центромеры хромосомы 8 ярко выделяются на общем фоне синей флуоресценции ядерной ДНК, обеспечиваемой конткрасителем DAPI. По сравнению со стандартными цитогенетическими методами, процедура CEP обеспечивает более высокий процент интерпретируемых ядер на слайде и позволяет проводить визуальный подсчет восьмой хромосомы внутри ядер. Результаты исследований представлены как процент ядер с 0,1, 2,3,4 и более 4 флуоресцентных сигналов. Каждому флуоресцентному сигналу соответствует центромера 8 хромосомы. Ядра, демонстрирующие 2 флуоресцентных сигнала, называются «двусигнальными». Ядра, демонстрирующие 3 флуоресцентных сигнала, называются «трехсигнальными».



CEP 8 DNA зонд представляет собой меченую флуорохромом SpectrumOrange пробу, специфичную для богатой альфа-сателлитной последовательности ДНК в центромерной области хромосомы 8 (8p11.1-q11.1). Этот анализ предназначен для обнаружения и количественной оценки хромосомы 8 как в интерфазных и метафазных ядрах методом FISH.

РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Необходимые материалы

Набор содержит четыре реагента в количестве, достаточном для проведения приблизительно 20 анализов. За один анализ принимается анализ участка-мишени размером 22 x 22 мм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Таблица 1. Набор зондов CEP® 8 SpectrumOrange (№ партии 30-160008, Кат номер 07J20-008)
ДНК-зонд CEP 8 плазмида *E. coli* (зонд предварительно денатурирован) Vysis Кат. No: 30-17008, концентрация **5 нг/мл**

Количество: 220 мкл в одном флаконе
Хранение: -20°C в темном месте
Состав: Меченный флуорофором SpectrumOrange (оранжевая окраска) альфа-сателлитный ДНК-зонд. ДНК-зонд, предварительно смешан в ДНК блокирующем и гибридизационном буфере (сульфат декстрана, формамид, SCC).

- **DAPI II краситель**

Vysis Кат. No: 30-804841
Количество: 300 мкл в одном флаконе
Хранение: -20°C в темном месте
Состав: 125 нг/мл DAPI (4,6-диамидин-2-фенилиндол) в фенилендиамин дигидрохлориде, глицерине и буфере

- **NP-40 (детергент неионный)**

Vysis Кат. No: 30-804818
Количество: 1 мл в одном флаконе
Хранение: от -25°C до 30°C
Состав: NP-40

- Соли 20X SSC

Vysis Кат. No: 30-805850
Количество: 66 г в одном контейнере
Хранение: от -20°C до 25°C
Состав: хлорид натрия и цитрат натрия

Таблица 2
Таблица 2. Набор зондов CEP® 8 SpectrumOrange с контрольными слайдами ProbeCheck (№ партии 32-160008, номер партии 07J22-008).

ProbeChek отрицательные контрольные слайды 0%, трисомия 8/12/
Фиксированные биологические образцы, полученные от нормальных (0%, трисомия 8/12), культивируемых человеческих лимфобластных клеток на предметных стеклах микроскопа (номер партии 30-805000)

Количество: 5 слайдов
Хранение: -20°C

ProbeChek положительные контрольные слайды 10%, трисомия 8/12/
Фиксированные биологические образцы, полученные от нормальных (0%, трисомия 8/12), культивируемых человеческих лимфобластных клеток на предметных стеклах микроскопа (номер партии 30-805000)

Фиксированные биологические образцы, полученные от нормальных (10%, трисомия 8/12 и 90% дисомия 8/12), культивируемых человеческих лимфобластных клеток на предметных стеклах микроскопа (номер партии 30-805002)

Количество: 5 слайдов
Хранение: -20°C

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение и обращение с набором

Невскрытый набор ДНК зондов CEP 8 следует хранить при -20°C в сухом и защищенном от света и влажности месте. Контрольные стекла ProbeChek хранят при -20°C в темном месте в герметично закрытом контейнере с осушителем для защиты от влажности. Соли 20X SSC и NP-40 можно хранить отдельно при комнатной температуре. Срок годности каждого невскрытого компонента набора указан на его этикетке. Эти требования к условиям хранения относятся и к вскрытым, и к невскрытым компонентам.

Необходимые материалы, не входящие в набор

Лабораторные реагенты

- Формамид сверхчистый. Хранить при 4ºC в течение одного месяца с момента получения (см. рекомендации производителя).
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированная соляная кислота (12N) (HCl)
- 1N NaOH
- Очищенная воды (дистиллированная, деионизованная или обработанная на Milli-Q)
- Фиксатор(3:1 (v:v) метанол:ледяная уксусная кислота)
- Drierite и газообразный азот
- Клей

Лабораторное оборудование

- Флуоресцентный микроскоп, снабженный рекомендуемыми фильтрами
- Фазово-контрастный световой микроскоп
- Предварительно вымытые предметные стекла для микроскопа
- Нагреватель для стекол (45-50°C)
- Покровные стекла 22 x 22 мм
- Микролитровая пипетка (1-10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0,5 или 1,5 мл)
- Таймер
- Магнитная мешалка
- Мешалка вортекс
- Микроцентрифуга
- Градуированный цилиндр
- Водяные бани (67±2°C, 73±1°C)
- Воздушный инкубатор (42°C)
- Алмазный резец
- Увлажненная камера для гибридизации
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Емкости Коплина (6). Рекомендуемый тип: Wheaton, Кат. No. 900620, емкость для вертикального окрашивания
- pH-метр и бумажные pH-полоски
- Градуированный термометр
- Коробка для предметных стекол с крышкой
- Резиновый герметик
- Фильтр с порами 0,45 мкм

Микроскоп и дополнительные принадлежности

Микроскоп: Эпи-флуоресцентный микроскоп необходим для оценки результатов гибридизации. *Если флуоресцентный микроскоп уже имеется, нужно убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальную визуализацию образцов, анализируемых с помощью флуоресцентной гибридизации in situ*. Микроскоп, который используется с обычными красителями ДНК (DAPI, йодид пропидия и хинакрин) могут не подойти для FISH-анализа. Рекомендуется

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

проводить рутинную чистку микроскопа, а также периодическую настройку техническим представителем производителя.

***Примечание**: Часто вместо предполагаемого плохого качества реагентов при анализе in situ на самом деле имеет место неисправная работа флуоресцентного микроскопа или использование несоответствующих фильтров.*

Источник возбуждающего света: Рекомендуется ртутная лампа на 100 Вт со сроком службы около 200 часов. Записывайте время использования лампы и замените ее до истечения номинального срока годности. Убедитесь, что лампа юстирована.

Объективы: При работе с микроскопом с ртутной лампой на 100 Вт используйте иммерсионные флуоресцентные объективы с апертурой ≥0,75. Для сканирования подходит объектив 40X в сочетании с окулярами 10X. Удовлетворительные результаты FISH-анализа могут быть получены при использовании иммерсионных ахроматических объективов 63X или 100X.

Иммерсионное масло: С иммерсионными объективами используйте иммерсионное масло с низкой фоновой флуоресценцией и предназначенное специально для флуоресцентной микроскопии.

Фильтры: Комплект фильтров для флуоресцентного микроскопа с несколькими полосами пропускания, оптимизированных для использования с наборами ДНК-зондов CEP, можно приобрести у Vysis для большинства моделей микроскопов. Для работы с набором CEP 8 SpectrumOrange рекомендуется использовать комплект фильтров с двойной полосой пропускания DAPI/Orange. Фильтры позволяют одновременно возбуждать и испускать спектр оранжевых и голубых (DAPI) флуорохромов. Для получения дополнительной информации по фильтрам Abbott свяжитесь с отделом молекулярной поддержки (1-800-553-7042 в США и за пределами США +49-6122-508).

Подготовка рабочих растворов реагентов

20X SSC

Для приготовления 20X SSC pH 5.3, смешайте:

66 г	20X SSC
200 мл	очищенной воды
250 мл	конечный объем

Тщательно размешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите pH до 5.3 с помощью концентрированной соляной кислоты. Доведите общий объем до 250 мл очищенной водой. Профильтруйте через фильтрационное устройство с диаметром пор 0.45 мкм. Храните при комнатной температуре до 6 месяцев.

Раствор для денатурации (

70%-ный формамид / 2X SSC, pH 7,0-8,0)

Для приготовления раствора для денатурации смешайте:

49 мл	формамида
7 мл	20X SSC, pH 5,3
14 мл	очищенной воды
70 мл	итоговый объем.

Тщательно перемешайте. С помощью pH-метра со стеклянным электродом измерьте pH при комнатной температуре, чтобы убедиться, что она в пределах 7,0-8,0. Раствор можно использовать в течение 1 недели. Проверяйте pH перед каждым использованием. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере.

Спиртовой промывочный раствор

Приготовьте 70% и 85% (об./об.) растворы спирта из 100% этанола и очищенной воды. Разведенный спирт можно использовать в течение одной недели, если не происходило испарения или раствор не становился более разбавленным в результате интенсивного использования. Храните не использующийся раствор при комнатной температуре в плотно закрывающейся емкости.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0.4X SSC промывочный раствор

Для приготовления смешайте:

20 мл	20X	SSC,	pH	5.3
950 мл	очищенной			воды
1000 мл	конечный объем			

Тщательно размешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите pH до 7.0-7.5 с помощью 1N NaOH. Доведите общий объем до 1 л очищенной водой. Профильтруйте через фильтрационное устройство с диаметром пор 0.45 мкм. Выливайте использованный раствор в конце каждого дня. Храните при комнатной температуре до 6 месяцев.

0.1% NP-40 в 2X SSC

Для приготовления смешайте:

100 мл	20X SSC, pH 5.3849 мл
849 мл	очищенной воды
1 мл	NP-40
1000 мл	конечный объем

Тщательно размешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите pH до 7.0-7.5 с помощью 1N NaOH. Доведите общий объем до 1 л очищенной водой. Профильтруйте через фильтрационное устройство с диаметром пор 0.45 мкм. Выливайте использованный раствор в конце каждого дня. Храните при комнатной температуре до 6 месяцев.

Меры предосторожности

1. Набор предназначен только для диагностики in vitro.
2. Все биологические образцы рассматриваются как возможные переносчики инфекции. Контрольные препараты ProbeChek из этого набора приготовлены из лимфобластоидных клеточных линий человека, фиксированных несколько раз в растворе метанола: уксусной кислоты (3:1) *Часто невозможно убедиться в инфекционной безопасности образца, поэтому со всеми образцами человека и контрольными препаратами следует обращаться, соблюдая универсальные меры предосторожности. Руководство по обращению с такими образцами можно получить в Центрах контроля и профилактики заболеваний США*[11].
3. Условия гибридизации могут изменяться при использовании других реагентов, кроме реагентов, поставляемых Abbott Mol.
4. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и детекции может привести к получению неприемлемых или неправильных результатов.
5. Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Это относится и ко всем этапам работы с гибридизованными препаратами. Проводите все манипуляции, не требующие света (инкубация, промывка и т.д.), в темноте.
6. CEP 8 ДНК-зонд содержит формамид — тератоген. Не допускайте его контакта с кожей и слизистыми.
7. Измерение температуры растворов, водяных бань и инкубаторов следует проводить градуированными термометрами.
8. Все опасные материалы следует утилизировать в соответствии с местными и государственными правилами.

CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях[18], OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови[19], CLSI документ M29-A3[20], и 3 других соответствующих биобезопасности руководства[21]. Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[18]
• Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.[14]

ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

NP-40

H302	Опасно при попадании внутрь
H318	Может вызвать серьезное повреждение глаз
H412	Опасно для водных организмов с отдаленными последствиями
P280	Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/защиту для глаз
P264	Тщательно мойте руки после работы
P273	Избегайте попадания в окружающую среду
P305+ P351+ P338	При попадании в глаза: Промойте водой в течении нескольких минут. Снимите контактные линзы, если носите, чтобы обеспечить доступ. Продолжайте промывать .
P501	Материалы и емкости должны быть утилизированы безопасным способом.

Информация о Паспортах Безопасности: важная информация о безопасности, обращении, транспортировке и утилизации данного продукта содержится в Паспортах безопасности.

Паспорта безопасности для всех реагентов (MSDS), входящих в наборы, доступны по запросу в Службе Технической Поддержки (1-800-553-7042 в США и за пределами США +49-6122-580).

Сбор образцов, обработка, хранение и подготовка препаратов на стеклах

Получение и обработка образцов

Сбор костного мозга необходимо проводить в соответствии с лабораторными правилами, В учебнике АСТ цитогенетической лаборатории содержатся рекомендации по сбору образцов и их культивированию[7]. В соответствии с правилами АСТ рекомендуется проводить сбор костного мозга либо в транспортной среде на основе натриевой соли гепарина, либо в вакутейнер с натриевой солью гепарина. По правилам АСТ оба варианта являются приемлемыми[2]. Образцы костного мозга не должны быть контаминированы кровью в значительном количестве, так как ее присутствие может разбавить костный мозг и повлиять на результаты анализа соотношения донор/реципиент.
В соответствии с правилами АСТ рекомендуется, чтобы образцы, предназначенные для отправки в цитогенетическую лабораторию, и культуры костного мозга были немедленно инициированы. В АСТ учебнике содержатся рекомендации по культивированию и сбору клеток. Перед культивированием и сбором костный мозг нельзя замораживать. Собранные клетки костного мозга могут сразу использоваться для приготовления стекол или могут храниться в фиксаторе при –20°C[2]. Иктерические или гемолизированные образцы могут препятствовать получению культур, приемлемых для цитогенетического анализа. Не допускайте воздействия кислот, сильных оснований и чрезмерного тепла на препараты. Все это может привести к повреждению ДНК и получению неправильных результатов FISH.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление препаратов фиксированных клеток на предметных стеклах

Для приготовления стекол из культивированных образцов может использоваться следующая методика:

1. Поместите водяную баню и влажную камеру во влагонепроницаемый контейнер с фронтальным доступом. Плотно укройте переднюю часть контейнера пластиковым упаковочным материалом таким образом, чтобы не блокировать полностью доступ вовнутрь. Если комнатный гигрометр показывает значение меньше 45%, влажную камеру можно использовать.
2. Предварительно нагрейте водяную баню до 67±2°C. Поместите штативы с пробирками по центру водяной бани так, чтобы они не касались стенок бани. Поддерживайте уровень воды в водяной бане по верхнему краю штатива на протяжении всей процедуры.
3. Подготовьте суспензию клеток с фиксатором Карноя так, чтобы суспензия слегка опалесцировала.
4. Промойте предметные стекла для микроскопа путем орошения обеих сторон стекла 70% этанолом (используйте сжимаемую пластиковую емкость). Вытрите стекла досуха с помощью промокательной бумаги по всей длине стекла с помеченного конца. Промаркируйте стекла с помощью алмазного резца. Используйте карандаш для нанесения маркировки в виде цветной насечки.
5. Погрузите промытое стекло в емкость Коплина с фиксатором Карноя. Поворачивайте стекло для равномерного нанесения фиксатора на его верхнюю поверхность.
6. Выньте и держите стекло над водяной баней. С помощью пастеровской пипетки нанесите 2 – 4 капли образца клеточной суспензии по всей длине стекла.
7. Поместите стекло образцом кверху наверх штатива для пробирок в водяной бане. Сушите стекло 10 минут.
8. Выньте стекло из штатива и просмотрите его под микроскопом с фазовым контрастом. Определите число интерфаз на поле при низком разрешении (10X объектив). Для получения оптимальных результатов анализа требуется, чтобы в поле при низком разрешении находилось минимум 100 клеток. Добавьте необходимое количество свежего фиксатора Карноя в клеточную суспензию для получения рекомендуемого числа интерфазных ядер.
9. Аккуратно очертите область, содержащую интерфазные ядра, на обратной стороне стекла с помощью алмазного резца. Поскольку для образования зоны гибридизации будет использоваться покровное стекло с размерами 22мм x22 мм. Очерченная зона должна соответствовать этим размерам. На одно предметное стекло можно помещать до двух покровных стекол.
10. Поместите стекла с образцами в пенал для хранения стекол.
11. Перед проведением гибридизации или хранением выдержите стекла с образцами при комнатной температуре в течение суток в закрытом пенале.

Хранение предметных стекол

Храните подготовленные предметные стекла в закрытом пенале при -20°C до проведения гибридизации. Поместите пенал в пластиковый мешок, наполненный газообразным азотом и содержащий примерно одну столовую ложку Drierite.

Процедура анализа

Краткое описание процедуры флуоресцентной гибридизации in situ

Денатурация ДНК в образце

1. Заранее подогрейте до 42°C камеру для гибридизации (воздухонепроницаемый контейнер), поместив ее перед подготовкой препаратов в инкубатор с температурой 42°C.
2. Налейте раствор для денатурации в емкость Коплина и поместите на водяную баню с температурой 73±1°C по крайней мере на 30 минут. Проверьте температуру раствора перед использованием.
3. Проведите денатурацию ДНК в образце, погрузив подготовленные стекла в раствор для денатурации с температурой 73±1°C (≤4 стекол на 1 емкость Коплина) на 5 минут. Не проводите денатурацию более 4 препаратов в одной емкости Коплина одновременно.
4. С помощью пинцета извлеките стекла из раствора для денатурации и сразу погрузите их в промывочный раствор 70%-ного этанола комнатной температуры. Поболтайте стекло для удаления формамида. Оставьте стекла в этаноле на 1 минуту.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Извлеките стекла из 70%-ного этанола. Повторите этап 4 с 85%-ным этанолом, а затем — 100%-ным этанолом.
6. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла лабораторной салфеткой.
7. Просушите стекла на нагревателе для стекол в течение не более 2 минут при 45-50°C, пока вы не будете готовы добавить раствор зондов.

Примечание: Если в процессе проведения гибридизации на подготовку зондов может понадобиться более двух минут, стекло необходимо оставить в емкости со 100% спиртом. Не давайте стеклу высохнуть на воздухе перед его помещением в нагреватель для стекол.

Подготовка зондов

1. Дайте раствору зондов прогреться до комнатной температуры, пока его вязкость не уменьшится достаточно для точного пипетирования.
2. Перемешайте на вортексе. Отцентрифугируйте каждую пробирку в течение 1-3 секунд с помощью настольной микроцентрифуге, чтобы содержимое пробирки стекло на дно пробирки. Снова аккуратно перемешайте на вортексе.

Гибридизация

1. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную область-мишень стекла. Сразу накройте эту область покровным стеклом размером 22 х 22 мм и дайте смеси равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха мешают гибридизации, поэтому не допускайте их образования.

Примечание: Не добавляйте раствор зондов на область-мишень, пока не подготовлены покровные стекла.

2. Поместите стекла в предварительно нагретую до 42°C камеру для гибридизации и плотно закройте камеру крышкой.
3. Поместите камеру со стеклами в инкубатор, нагретый до 42°C как минимум на 30 минут, чтобы прошла гибридизация.

Примечание: Более длительная гибридизация может потребоваться для повышения интенсивности сигнала в некоторых образцах. Инкубацию можно проводить в течение ночи (до суток). При инкубации, превышающей 1 час, покровные стекла следует заклеить с помощью резинового герметика, и гибридизационная камера должна быть увлажнена. Процедура описана ниже:

- Наберите герметик в шприц на 5 мл. Выдавите его небольшое количество по краям покровного стекла, захватывая и покровное, и предметное стекла, формируя таким образом изолирующий слой вокруг покровного стекла.
- Поместите стекла в увлажненную камеру для гибридизации (воздухонепроницаемый контейнер с кусочком влажной фильтровальной бумаги размером около 1 х 3 дюйма).
- Плотно закройте камеру крышкой и инкубируйте в течение 1-16 часов.
- После инкубации удалите резиновый герметик с покровного стекла.

Промывка после гибридизации

1. Налейте 0.4X SSC (pH 7.0-7.5) в емкость Коплина. Подогрейте буфер, поместив емкость Коплина на водяную баню с температурой 73±1°C по крайней мере на 30 минут, или пока раствор не нагреется до 73±1°C.

Примечание: Если предполагается провести гибридизацию более 4-х стекол, их следует промывать в несколько партий. Промывочный раствор следует нагревать до 73±1° С перед промывкой каждой партии.

2. Снимите покровное стекло с области-мишени первого стекла, и немедленно перенесите стекло в емкость Коплина, содержащую 0.4X SSC при температуре 73±1°C. Поболтайте стекло в буфере в течение 1-3 секунд. Повторить операцию для остальных трех стекол и инкубировать 2 мин при 73±1°C.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание: Не снимайте покровные стекла с нескольких предметных стекол перед их помещением в промывочную баню. Начните 2-минутный отсчет инкубации, когда последнее стекло будет добавлено в промывочную баню.

3. Извлеките каждое стекло из промывочной бани и поместите их в емкость, содержащую 2X SSC/0.1% NP-40, при комнатной температуре на 5-60 сек, встряхивая их в течение 1-3 сек после помещения в баню.
4. Высушите стекла на воздухе в темноте в вертикальном положении. (Подойдет закрытый ящик или полка внутри закрытого шкафа.)
5. Нанесите 10 мкл красителя DAPI II на отмеченную область стекла и накройте покровным стеклом. До проведения подсчета храните препараты в темном месте.

Хранение препаратов

Гибридизованные препараты (с покровными стеклами) храните при -20°C в темном месте. При этих условиях стекла могут храниться до 12 месяцев без существенной потери интенсивности флуоресцентного сигнала. При длительном хранении покровные стекла можно заклеить герметиком для предотвращения испарения, и предметные стекла храните при -20°C.

Подсчет сигналов

Оценка приемлемости препарата

Приемлемость препарата оценивается по следующим критериям:

- Интенсивность сигнала зонда: сигнал должен быть ярким, четким и легко оцениваемым. Сигналы должны быть в форме либо яркого овала с четкими границами, либо вытянутого овала с расплывчатыми границами.
- Фон: фон должен быть темным или черным и относительно свободным от флуоресцирующих частиц или помутнений.
- Специфичность объектной области в отношении перекрестной гибридизации: Зонд должен гибридизоваться и окрашивать только объектную область (центромера 8 хромосомы). Метафазные пластинки следует исследовать для идентификации любой перекрестной гибридизации необъектных последовательностей. По крайней мере, 98% клеток дают один или более сигналов для приемлемой гибридизации (см. правила по подсчету сигналов, описанные ниже).

Если любой из выше перечисленных признаков не удовлетворяет критериям приемлемости, обратитесь к разделу по устранению возможных проблем (Таблица 3) и приготовьте новый препарат.

Выбор оптимального для анализа участка и ядер, подлежащих оценке

Для просмотра гибридизованной области и определения подходящего участка используйте объектив 25X. Выбирайте области, в которых образец распределен равномерно, лишь несколько интерфазных ядер или метафазных пластинок могут перекрываться, и несколько интерфазных ядер или метафазных пластинок могут быть просканированы в поле обозрения. Не анализируйте ядра с нечеткими границами. Пропускайте ядра с сомнительными сигналами, требующими субъективного решения. Пропускайте сигналы слабой интенсивности и неспецифичные, а также при фоновых помехах. Пропускайте ядра, недостаточно окрашенные для определения их границ. Подсчитывайте только клетки с дискретными сигналами.

Сканирование при подсчете сигналов

С помощью объектива 40X или 63X начните анализ верхнего левого квадранта выбранной зоны и, сканируя слева направо, подсчитайте число сигналов в каждой доступной метафазной пластинке или внутри границ ядер в каждой доступной интерфазной клетке. Зоны на стекле с высокой плотностью клеток следует отбросить для того, чтобы просканировать всю область-мишень. Продолжайте сканирование до тех пор, пока не будет просчитано и проанализировано 500 интерфазных ядер и минимум 20 метафазных пластинок. Если в более чем 5% ядер не было гибридизационного сигнала после подсчета 200 ядер, данное стекло следует обозначить как неудавшаяся гибридизация и результаты по данному стеклу не сообщаются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подсчет интерфазных сигналов

Подсчитайте число флуоресцентных сигналов в каждом доступном интерфазном ядре с помощью объектива 40X или 63X. Следуйте правилам подсчета сигналов **Таблицы** . Объективы с большим разрешением (например, 63X или 100X) должны использоваться для разрешения спорных случаев расщепления или размытости сигналов.

- Два сигнала примерно одинакового размера, находящиеся друг от друга на близком расстоянии, но не имеющих видимого соединения, считаются как два сигнала.
- Считайте размытый сигнал как один сигнал, если сигнал непрерывный и в приемлемых границах.
- Два малых сигнала, имеющих видимое соединение, считаются как один сигнал.
- Посчитайте число ядер с 0, 1, 2, 3, 4 или >4 сигналов. Считайте ядра с нулевым сигналом, только если другие ядра с нулевым сигналом присутствуют в поле зрения. Если точность подсчета сомнительна, повторите подсчет в другой области стекла.
- Не учитывайте ядра с неясными сигналами.

Подсчет метафазных сигналов

- Метафазные пластинки должны иметь хромосомы, которые хорошо отделены друг от друга, но имеют происхождение из одной клетки. Выберите минимум 20 полных метафазных пластинок хорошего качества с четко определенными не перекрывающимися хромосомами для подсчета и анализа хромосом.
- Сигнал зонда CEP 8 ДНК проявляется в виде четкого флуоресцентного сигнала, локализованного около центромерной области 8 хромосомы. Сигнал CEP может быть расщеплен (два малых сигнала на близком расстоянии друг от друга) в случае разделения хроматид. Разделение хроматид происходит, когда клетка находится на боле поздних стадиях митоза (между метафазой и анафазой). Расщепленный сигнал, найденный на каждой из двух хроматид, должен учитываться как один сигнал. Следуйте общим рекомендациям по увеличению и сканированию, как указано выше в Разделе Интерфазный подсчет.

Рисунок
Руководство к оценке количества интерфазных сигналов

1		Не подсчитывается. Ядра накладываются друг на друга, области обоих ядер не видны.
2		Считается как два сигнала. Один сигнал компактный, другой расплывчатый.
3		Не подсчитывается. Ядра накладываются друг на друга, границы ядер не видны полностью.
4		Считается как два сигнала. Один сигнал раздвоенный.
5		Считается как три сигнала.
6		Считается как три сигнала. Один сигнал слитный.
7		Считается как четыре сигнала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3
Возможные проблемы и их устранение

Проблема	Возможная причина	Решение
• Отсутствие сигнала или слабый сигнал	• Использовался несоответствующий комплект фильтров • Неправильная работа микроскопа • Использованы несоответствующие лампы (ксеноновые или вольфрамовые) • Использованы ртутные лампы с истекшим сроком службы • Ртутная лампа не юстирована • Коллекторные линзы загрязнились или треснули • Зеркало в корпусе для лампы загрязнилось или разбито • Пробы денатурированы неправильно • Не соблюдены условия гибридизации • Неправильные условия промывки • Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, которые затрудняют доступ для зондов • Не соблюдены условия хранения проб	• Используйте рекомендуемые фильтры • Свяжитесь с техническим представителем фирмы-производителя микроскопа • Используйте ртутные лампы (желательно на 100 Вт) • Установите новую лампу • Отъюстируйте ртутную лампу • Промойте или замените линзы • Промойте или замените зеркало • Проверьте температуру водяной бани (73±1°C) • Проверьте температуру в инкубаторе (42°C) • Увеличьте время гибридизации как минимум до 1 часа • Проверьте температуру водяной бани (73±1°C) • Проверьте состав раствора для водяной бани (например pH) • Покровное стекло должно наноситься сначала путем прикосновения к поверхности гибридизационной смеси • Хранить при -20°C в темноте
• Низкая специфичность сигнала	• Неправильные условия гибридизации • Слишком низкая температура промывки	• Проверьте температуру в инкубаторе (42°C) • Поддерживайте температуру промывки при 73±1°C
• Фоновые помехи на стеклах	• Метафазные пластинки содержат слишком много цитоплазмы • В клеточных препаратах находится клеточный дебрис • ДНК в образцах недостаточно чистая • Использование широкополосного фильтра, пропускающего много света • Промывание при неправильной температуре	• Увеличьте время денатурации стекол до 10 мин. • Промойте клеточный препарат 5 раз свежим фиксатором и повторите процедуру нанесения • Замените промывочный раствор после гибридизации 0.4X SCC промывочным раствором на основе формамида следующим образом: 1. промыть стекла 3 раза в течение 10 мин каждое в растворе 50%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	или неправильным составом промывочного раствора • Стекла промыты недостаточно перед нанесением на них клеток-мишеней	формамида/2X SSC, pH 7.5-8.0 при 46±1°C 2. промыть стекла 1X раз в течение 10 минут в 2X SSC при 46±1°C 3. промыть стекла 1X раз в течение 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при 46±1°C • Замените на фильтр с более узкой полосой пропускания или фильтр с несколькими полосами пропускания • Проверьте температуру бани, pH и/или состав • Замочите стекла в этаноле и просушите с помощью фильтровальной бумаги перед нанесением клеток
• "Искаженная морфология хромосом	• Слишком быстрая сушка стекол в процессе подготовки образцов • Стекла не готовы к проведению денатурации • Стекла недостаточно хорошо высушены перед денатурацией • Слишком высокая температура в бане для денатурации	• Увеличьте относительную влажность в процессе подготовки образцов на стеклах • Увеличьте температуру водяной бани в процессе подготовки образцов на стеклах • Увеличьте время сушки образцов на стеклах • Выдерживайте стекла не менее суток при комнатной температуре перед проведением денатурации • Нагрейте стекла перед денатурацией до 45°C в течение 10-15 мин. • Проверьте температуру водяной бани
• Слишком яркий сигнал	• Концентрация зонда слишком высокая для вашего микроскопа	• Попытайте блокировать некоторые сигналы путем помещения фильтра с нейтральной плотностью на пути возбуждающего луча

Интерпретация результатов

Результаты подсчета 500 интерфазных ядер представлены как количество и процент ядер с 1,2,3,4 и более 4 сигналами. Клинические образцы с>2.2% трехсигнальных ядер считаются имеющими аномальный клон трисомии 8 хромосомы; те, у кого меньше ≤2,2% , считаются нормальными, хотя полностью исключить наличие трисомии 8 хромосомы нельзя. Когда процент трехсигнальных интерфазных ядер близок к пороговому значению (2.0-2.5%), результаты следует интерпретировать с острожностью. Опубликованы результаты подсчета 20 30 метафазных ядер как число и процент метафаз с 1,2,3,4 и более 4 сигналов. Интерпретация результатов проводится по тем же правилам, что и стандартный цитогенетический анализ. Согласно этим правилам, образец отрицателен для трисомии 8 хромосомы, если трисигнальные метафазы не обнаружены в 20 метафазах, и образец положительный для трисомии 8 хромосомы, если ≥2 метафаз с двойным сигналом находится в 20-30 метафазах. Если обнаружена одна метафаза с тройным сигналом, подсчитываются дополнительно 10 метафаз. Если обнаружена одна метафаза с тройным сигналом. Если только одна трисомия 8 хромосомы обнаружена в 30 метафазах, образец считается неоднозначным. Если стандартные цитогенетические результаты и результаты FISH не совпадают, или не соответствуют клиническим данным, следует внимательно изучить расхождения. Расхождения в результатах теста могут быть связаны с неточными результатами одного или нескольких методов тестирования, различия в аналитической чувствительности/специфичности среди методов, фактических различий в статусе хромосомы 8 среди популяционных клеток, оцененные различными методами (например циклирующие метафазные клетки против нециклирующих межфазных клеток). Когда результаты одного или нескольких методов являются неоднозначными, или когда процентное соотношение трехсигнальных интерфазных ядер находятся вблизи порогового значения (от 2,0 до 2,5%), результаты следует интерпретировать с осторожностью и может потребоваться дальнейшая оценка испытуемого образца. Повторите FISH исследование и/или повторите стандартный цитогенетический анализ с оставшимся образцом, это может быть полезно для оценки

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

возможностей неправильных результатов испытаний. Если основание для каких-либо расхождений в результатах проверки не установлено или если результаты теста не соответствуют клиническим данным, необходима консультация между цитогенетиком и лечащим врачом.

Ограничения

1. Набор ДНК-зондов CEP 8 SpectrumOrange предназначен только для хромосом в интерфазных ядрах или метафазных пластинках из образцов костного мозга.
2. Клиническая интерпретация результатов любого теста должна проводится в сочетании со стандартным цитогенетическим анализом и должна оцениваться в контексте истории болезни пациента и других результатов диагностических лабораторных тестов.
3. Клинические образцы с >2,2% трисигнальных ядер считаются имеющими аномальный клон трисомии 8. Те, у кого <2,2% трисигнальных ядер считаются нормальными, хотя наличие трисомии не исключено полностью.
4. Набор ДНК-зондов CEP 8 не предназначен для работы на материале для культивирования клеток, таких как моноциты, фибробласты и опухолевые клетки.
5. Результаты FISH-анализа могут быть неинформативными, если качество образцов или подготовка слайдов выполнены неадекватно.
6. Если контаминация периферической кровью присутствует в образцах костного мозга, кровь может разбавить образец; это важно, для того, чтобы распознать потенциальные эффекты этого разбавления, что может повлиять на результат FISH –исследования.
7. Не исключено, что у пациентов может быть хромосомный полиморфизм, гибридизующийся с зондом CEP 8. Метафазный FISH анализ следует проводить в дополнении к интерфазному FISH-анализу. Полиморфизм в клинических испытаниях не исследовался.
8. Данный анализ не обнаружит присутствие других хромосомных аномалий, связанных с гематологическими нарушениями.
9. Эффективность этого анализа для мониторинга трисомии 8 хромосомы или прогрессирования заболевания не было продемонстрировано.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Подсчет интерфазных сигналов проводился на образцах костного мозга, выделенных у нормальных доноров и от доноров, положительных по трисомии 8 хромосомы для оценки ожидаемого процента клеток с 0, 1,2,3,4 и ≥4 сигналов для этих двух состояний и определение порогового значения для детекции присутствия или отсутствия трисомии 8 хромосомы. Каждый образец подсчитывается как процент клеток с 0, 1,2,3,4 и ≥4 сигналов.

Значения среди нормальных образцов костного мозга.

Изначально интерфазный FISH-анализ проводился на образцах костного мозга от 35 доноров. Распределение сигнала для этого исследования представлено в **Таблице 4.**

Таблица 4. Распределение процентного содержания клеток с CEP 8 сигналом в 35 образцах костного мозга

	Процент клеток с				
	0 сигналов	1 сигнал	2 сигнала	3 сигнала	≥4 сигналов
Среднее	0,22	2,23	96,7	0,71	0,18
SD	0,20	0,91	0,88	0,52	0,13

Кроме того, было проведено базовое исследование цитогенетически нормальных образцов костного мозга, взятые в трех местах, чтобы подтвердить ожидаемые значения и для определения порогового значения анализа. Распределение сигналов для этих 60 образцов представлено в **Таблице 5.**

Таблица 5. Распределение процентного содержания клеток с CEP 8 сигналом в 60 образцах костного мозга

	Процент клеток с				
	0 сигналов	1 сигнал	2 сигнала	3 сигнала	≥4 сигналов
Среднее	0,11	2,67	96,7	0,41	0,14
SD	0,21	1,95	2,05	0,24	0,20

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Mertens F, Johansson M, Mitelman F. The pathogenetic significance of acquired trisomy 8 is not reducible to amplification of a single chromosome band. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995;83:176-177.
2. Barch MJ, ed. *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual.* 2nd ed. New York, NY: Raven Press, Ltd; 1991:17-105,297-536.
3. Jenkins RB, Le Beau MM, Kraker WJ, et al. Fluorescence in situ hybridization: A sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood.* 1992;70(12):3307-15.
4. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics.* Second Edition, New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.; 1995.
5. Testa JR. Cytogenetic Patterns in Polycythemia Vera. *Cancer Genet Cytogenet.* 1980;1:207-215.
6. Swolin B, Weinfeld A, Westin J. A prospective long-term cytogenetic study in polycythemia vera in relation to treatment and clinical course. *Blood.* 1988;72:386-395.
7. Sole F, Prieto F, Badia L, et al. Cytogenetic studies in 112 cases of untreated myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet.* 1992;64:12– 20.
8. Parlier V, Van Melle G, Beris P, et al. Hematologic, clinical, and cytogenetic analysis in 109 patients with primary myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 1994;78:219-231.
9. Yunis JJ. New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Human Pathology.* 1981;12(6):540-549.
10. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods.* Sixth Edition, Ames, IA: The Iowa State University Press; 1972.
11. U.S. Centers for Disease Control. *Morbidity and Mortality Weekly Review.* 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.
12. Sandberg AA. *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia.* 2nd ed. New York, NY: Elsevier Science Publishing Co; 1990.
13. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *PNAS USA.* 1986;83:2934-38.
14. Ploem JS, Tanke HJ. *Introduction to Fluorescence Microscopy.* New York, NY: Oxford University Press; Royal Microscopial Society. 1987.
15. Bradbury S. *An Introduction to the Optical Microscope*. Revised Edition. New York, NY: Oxford University Press; Royal Microscopial Society. 1991.
16. National Comprehensive Cancer Network, Inc. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Chronic Myelogenous Leukemia. Version 1.2013. 2012. NCCN Web site. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf. Accessed July 28, 2012.
17. National Comprehensive Cancer Network, Inc. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Myelodyplastic Syndromes. Version 1.2012. 2011. NCCN Web site. http://www.nccn. org/professionals/physician_gls/pdf/mds.pdf. Accessed July 28, 2012.
18. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009. [Also available online. *Type* > www.cdc.gov, *search* > BMBL5 > *look up* sections III and IV].
19. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; ApprovedGuideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
21. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или заходите на веб-сайт http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP и Vysis, SpectrumOrange и ProbeChek являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Abbott в различных юрисдикциях. Другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

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

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

©2006, 2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Апрель 2020
30-608315/R7

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru