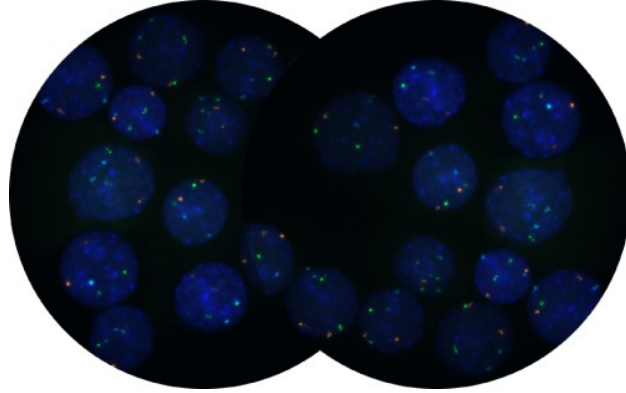




CYTOTEST™

CytoTest DNA FISH Probenun Kullanım Talimatı



CE

IVD

REF

Aşağıdaki REF gruplarına uygulanabilir
CT-PAC
CT-LSP
CT-CCP

İçindekiler

Ürün Bilgisi

Sembollerin Açıklamaları	3
Hedef Kullanıcı	3
Ürünün Ortak Adı	3
Kullanım Amacı.....	3
Kullanım Endikasyonları.....	3
Kontraendikasyonlar.....	4
Prosedür Esasları.....	4
Ürün Açıklaması.....	4
Uyarılar ve Önlemler.....	5
Depolama ve Taşıma	5
Sağlanan Malzemeler.....	5
Gerekli fakat Sağlanmamış Laboratuvar Ekipmanları	5

Analiz Prosedürü

<u>FFPE Örnekleri için FISH Prosedürü</u>	
Gerekli fakat Sağlanmamış Ayıraçlar	5
Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması	6
Parafine Gömülmüş Doku Bölümleri için FISH Prosedürü	6
<u>Sitolojik Örnekler için FISH Prosedürü</u>	
Gerekli fakat Sağlanmamış Ayıraçlar.....	7
Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması	7
Sitoloji için FISH Prosedürü	9
<u>Amniyotik Sıvı Örnekleri için FISH Prosedürü</u>	
Gerekli fakat Sağlanmamış Ayıraçlar	10
Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması	10
Amniyositler için FISH Prosedürü.....	12

Sonuç Yorumlaması

Amplifikasyon / Delesyon Problemleri için Sinyal Şekilleri.....	13
Kırılma-ayrılma Problemleri için Sinyal Şekilleri.....	13
Füzyon / Translokasyon Problemleri için Sinyal Şekilleri.....	13

Ekler

Referanslar.....	14
Üretici Bilgisi	14
Yetkili AT Temsilcisi Bilgisi	14

ÜRÜN BİLGİSİ

Sembollerin Açıklamaları



Katalog numarası



Üreticinin adı ve adresi



In vitro tanısal medikal cihaz



Avrupa Topluluğu'nda yetkili temsilci



< n > test için yeterli ayıraç içerir



Biyolojik riskler



Parti numarası



Kullanım için talimatlara bakınız



YYYY/AA/GG ile kullanım



Minimum/maksimum sıcaklık



Steril değil

Hedef Kullanıcı

CytoTest FISH Probları **Sadece Profesyonel Kullanım** için tasarlanmıştır.

Ürünün Ortak Adı

DNA Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) problemleri

Kullanım Amacı

FISH Probu, bilinen veya şüphelenilen sitogenetik ya da kromozomal anomalilerin tespit edildiği testlerde kullanılması için tasarlanmıştır.

Kullanım Endikasyonları

Birçok hematolojik ve diğer malignitelerin ilk testleri tipik olarak morfolojik, histolojik, immünofenotipik (akım sitometrik ve / veya immünohistokimyasal) ve konvansiyonel sitogenetik analizleri kapsar. FISH analizi genomik anormallikler ile ilgili herhangi bir hastalık için konvansiyonel karyotiplemeyi takiben veya buna ek olarak diagnostik değerlendirilmenin ayrılmaz bir bileşeni olabilir fakat özellikle aşağıdaki durumlarda endikedir:

1. Özellikle klinik, hematolojik ve patolojik parametreler spesifik bir anormalliği gösterdiğinde, yalnızca negatif sitogenetik sonuçların düşük sıklığa sahip fakat yüzdesi iyi belgelenmiş anormallikleri
2. "Yalnızca negatif" sitogenetikleri yüksek oranda olan anormallikler
3. Konvansiyonel sitogenetik testleri başarısız olduğunda veya mümkün olmadığında, örneğin fikse edilmiş dokular üzerinde interfaz analizleri
4. Anormal veya karmaşık geleneksel karyotipik bulguları netleştirmek için ve
5. Primer genetik bir olay için bir vekil belirteç olarak

Kontraendikasyonlar

Cihaz, aşağıdaki sınırlamalara tabiidir:

1. Bu ürün tedavi seçimi, terapötik yanıt tahmini ya da hastalık taraması gibi yüksek riskli kullanımlar için tasarlanmamıştır. Cihazın risk değerlendirmesi, hastalık takibi, tanı ve prognoz için kullanımı belirlenmemiştir.
2. Klinik, patoloji ve diğer ilgili bilgiler daima hasta örnekleri üzerinde yapılan FISH test sonuçları ile ilişkili olmalıdır. Test uygulanırken ve sonuçlar kullanılırken hastanın klinik durumu dikkate alınmalıdır.
3. FISH testi aşağıdaki anormalliklerin tespit edilmesi için uygun değildir:
 - a. Hedef DNA'da bir veya daha fazla nokta mutasyon, veya
 - b. Başka herhangi bir tek nükleotid düzeyinde bozukluk,
 - c. Küçük (kb-aralığının altında) delesyonlar, insersiyonlar, inversiyonlar
 - d. Baz çifti düzey doğruluğunda kesme noktası tanımlanması
4. Bu test gen ekspresyon seviyesi veya transkript türünün tespit edilmesine sağlamaz ve gen üretim miktarının ölçülmesini içermez.
5. Sonuçların yorumlanması: Olağandışı nokta / sinyal şekilleri nadir vakalarda görülebilir. Bu beklenmeyen desenler bilinmeyen öneme sahip olabilir ve tek başına bu test ile yorumlanamayabilir. Metafaz analizi bazı atipik veya beklenmeyen sinyal şekillerinin nitelendirilmesinde yardımcı olabilir.
6. FISH prob performans özellikleri, insan periferik kan lenfositlerinin örnekleri ve doku örnekleri üzerinde onaylanmıştır.
7. Cihazın diğer örnek türlerini test etmek için kullanımı kapsamlı olarak test edilmemiş olabilir ve protokol optimizasyonu ile ayarlama gerekebilir.

Prosedür Prensipleri

Floresan *In situ* hibridizasyon (FISH) dokularda, hücrelerde veya kromozomlar üzerindeki DNA veya RNA dizilerinin varlığı veya yokluğu, yeri, bütünlüğü ve miktarını tespit etmek için tasarlanmış güçlü bir tekniktir. FISH, bazların nükleik asidin komplementer tek zincirleri üzerinde eşleştirilmesi ile spesifik dizilerin tespitine dayalı çalışır. Burada zincirlerden birisi, prob sekansını tamamen veya yüksek oranda tamamlayan diziler ile sadece genomun bu kısımlarına bağlanan floresan etiketli sekans fragmentidir (probudur) ve diğer zincir analiz edilecek örnek olur. Buna göre, *in situ* hibridizasyon probun ve analiz edilecek örneklerin hazırlanması ile başlar. Örneklerdeki tipik çift zincirli DNA, tek zincirler halinde eritilmelidir (denatüre edilmelidir) ve prob, tespit edilebilmesi için floresan ile etiketlenmelidir.

Ürün Açıklaması

CytoTest problemleri *in vitro* tanısal medikal cihazlardır ve prob tipine bağlı olarak ya mikro kesilmiş insan kromozomları ya da klonlanmış DNA fragmentlerinden elde edilen genomik DNA ile üretilmektedir.

Optimal sonuçlar için problemlerini floresanları ile uyumlu olan mikroskop filtre setleri seçilmelidir.

Fluorofor	Eksitasyon Piki (nm)	Emisyon Piki (nm)	Diğer Boyalarla Karşılaştırılabilirlik
CytoRed™	583	605	Spektrum Kırmızı Propidiyum iyodür (543-614)
CytoOrange™	551	575	Spektrum Turuncu
CytoGold™	523	549	Spektrum Altın
CytoGreen™	495	518	Spektrum Yeşil Fluoresein izotiyosiyanat (FITC)
CytoAqua™	422	471	Spektrum Aqua
CytoBlue™	402	421	Spektrum Mavi (400-450)

Uyarılar ve Önlemler

Işığa aşırı maruziyet, prob floroforunun flor ışıltama bozunmasına neden olabilir. Doğrudan ve uzun süreli ışığa maruz kalmasını önlemek için probun içerdiği tüm ayıracıları ve kesitleri taşıırken uygun önlemler alınız. CytoTest FISH problemlerini taşıırken ve kullanırken Kullanım Talimatlarında açıklanan talimatlara göre hareket etmeniz önerilmektedir.

Deneyi yapan kişiler mutlaka uygun koruyucu giysi, eldiven ve göz/üz koruma aracı kullanmalıdır. FISH deneyinde kullanılan ayıracılar gözleri ve cildi tahriş edebilir; bu nedenle gözleriniz ve derinizle temasından kaçınınız. Gözle temas ettiğinde bol su ile yıkayınız ve doktora başvurunuz.

Taşıma veya depolama sırasında uygunsuz kullanım potansiyel aşağılamak ya da ürünün performansını bozabilir. Herhangi bir tehlikeye ürünler yürürlükteki herhangi bir yasa ya da kurum, bölge ve / veya ülke düzenlemelere göre atılmalıdır ve reaktifler herhangi testlerde kullanılan edilmemelidir. Eğer ürünün kalitesi veya performansı bozulma hakkında herhangi bir endişeniz varsa, üretici veya bölgesel distribütörü(ler) ile irtibata geçiniz.

Depolama ve Taşıma

CytoTest FISH problemleri -25 ° ila -15 ° sıcaklıkta saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır. Donma / çözülme döngülerinin tekrarlamaktan kaçınınız. Kullanmadan önce ürün etiketi üzerindeki son kullanma tarihini kontrol edin. Bu depolama ve taşıma koşulları hem açılmış hem de açılmamış ürünler için geçerlidir.

Sağlanan Malzemeler

CytoTest DNA FISH problemleri, kullanıma hazır konsantrasyonda tedarik edilmiştir.

Gerekli fakat Sağlanmamış Laboratuvar Ekipmanları

- Mikrolitre pipet (1 ila 10 µL) ve temiz uçlar
- Polipropilen mikrosantrifüj tüpleri (0,5 mL veya 1,5 mL)
- 22 mm x 22 mm cam lameller
- Lastik kaplama
- Dereceli silindir
- Elmas uçlu çizici
- Zamanlayıcı
- Forseps
- Koplın kavanoz
- Ortam şişeleri (250 mL)
- Kalibre edilmiş termometre
- Vorteks karıştırıcı
- Mikrosantrifüj
- Su banyoları (37 ± 2°C, 72 ± 2°C, ve 80 ± 2°C)
- Hava inkübatörü(37 ± 2°C)
- Kesit ısıtıcı
- Faz kontrast ışık mikroskobu
- Tavsiye edilen filtreler ile donatılmış floresan mikroskop

ANALİZ PROSEDÜRÜ

(Bu kullanım kılavuzundaki deneysel koşullar genel önerilerdir ve örnek materyalin durumuna bağlı olarak değişebilir. Belirli örnek türleri için ayarlanması gerekebilir.)

FFPE Örnekleri için FISH Prosedürü

Gerekli fakat Sağlanmamış Ayıracılar

- Parafin Ön İşlem Ayıracı Kiti (Cat No: CT-ACC112-05):
 - o Ön İşlem Solüsyonu (50 ml): Oda sıcaklığında (OS) saklayınız.
 - o Proteaz Tamponu (62,5 ml, pH 2,0): Oda sıcaklığında saklayınız.
 - o Proteaz (250 mg): Liyofiliz, -20°C'de saklayınız.
- FISH Ayıracı Kiti (Cat No: CT-ACC101-20):
 - o 20X Sodyum Klorür-Sodyum Sitrat Tampon (SSC) Tuzu: OS'da saklayınız, nemden uzak tutunuz.

- o 4',6-diamidino-2-fenilindol(DAPI) Karşıt Boya: 4°C'de karanlıkta saklayın
- o NP-40 (oktilfenoksipolietoksietanol, veya Nonidet P-40): OS'da saklayın.
- Ksilen: OS'da saklayın
- Etanol (100%): OS'da saklayın
- Arıtılmış su: OS'da saklayın
- Konsantre edilmiş (12N) HCl: OS'da saklayın

Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

1. 20X SSC Solüsyonu (pH 7,0)

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
SSC Salt	66 g	20X
Deiyonize H ₂ O (dH ₂ O)	250 ml	
TOPLAM	250 ml	

2. Proteaz Solüsyonu

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
Proteaz, liyofilize	250 mg	4 mg/ml
Proteaz Tampon	62,5 ml	
TOPLAM	62,5 ml	

3. 90% Etanol

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
Etanol (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOPLAM	100 ml	

4. 70% Etanol

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
Etanol (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOPLAM	100 ml	

5. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu (pH 7,0)

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
20X SSC Solüsyonu	10 ml	2X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	90 ml	
TOPLAM	100 ml	

Parafine Gömülmüş Doku Bölümleri için FISH Prosedürü

Kesit Hazırlanması

1. Kesitleri oda sıcaklığında 10 dakika boyunca ksilenle bekletin. Her defasında yeni ksilen ile iki kez tekrarlayın.
2. Kesitleri oda sıcaklığında %100 etanol içinde 5 dakika boyunca dehidrate edin. Yeni %100 etanol ile bir kez tekrarlayın.
3. Arzu edildiği takdirde kesitleri hava ile 2 – 5 dakika boyunca kurutun.
4. Kesitleri 80 °C'de 10 dakika boyunca önceden ısıtılmış Ön İşlem Solüsyonunda bekletin.
5. Kesitleri, OS'da 3 dakika boyunca arıtılmış suyun içinde bekletin.

Proteaz Ön İşlemi

1. Kesitleri, 37°C'de 10 – 60 dakika boyunca (örneğin durumuna bağlı olarak) Proteaz Solüsyonunda bekletin ve ışık mikroskobu altında hücrelerin durumunu izleyin.
2. Kesitleri OS'da 3 dakika boyunca arıtılmış suyun içinde bekletin.
3. Kesitleri 2-5 dakika boyunca havada kurutun.

Kesit Dehidrasyonu

1. Kesitleri 3 dakika boyunca %70 etanolde bekletin.
2. Kesitleri 3 dakika boyunca %90 etanolde bekletin.
3. Kesitleri 3 dakika boyunca %100 etanolde bekletin.
4. Kesitleri hava ile kurutun.

Probu Hazırlanması

1. Probu OS'da 20-30 dakika boyunca önceden ısıtın.
2. Probu hafifçe girdap halinde döndürün ve yavaşlatın.

Ortak Denatürasyon & Hibridizasyon

1. Her hibridizasyon alanının üzerine probun 10 µL'sini uygulayın ve 22 mm x 22 mm lamel ile kapatın. Lastik kaplama ile lamel(ler)i kaplayın.
2. Prob ile kesitleri 5 dakika boyunca 72 °C'de birlikte denatüre edin.
3. Kesitleri önceden ısıtılmış ve nemlendirilmiş hibridizasyon odasına yerleştirin ve 37 °C'de gece boyunca (16 saat) inkübe edin.

Hibridizasyon Sonrası Yıkama

1. Elmas uçlu kalem ile kesitlerin arkasında yer alan her hibridizasyon alanını işaretleyin.
2. Dikkatlice lastik kaplamayı çıkarın.
3. Lamellerin gevşemesi için kesitleri oda sıcaklığında Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonuna batırın. Lamellerin kendi başına ayrılmasına izin vermek için hafifçe sallayın; kapalı lamelleri çıkarmayın.
4. Kesitleri, 2 dakika boyunca 72 °C'de önceden ısıtılmış Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonunda bekletin.

Kesit Dehidrasyonu

1. Kesitleri 2 dakika boyunca %70 etanol içerisinde bekletin.
2. Kesitleri 2 dakika boyunca %90 etanol içerisinde bekletin.
3. Kesitleri 2 dakika boyunca %100 etanol içerisinde bekletin.
4. Kesitleri karanlıkta hava ile kurutun.

Görüntüleme

1. DAPI karşıt boyasını uygulayın ve kesitleri lameller ile kaplayın.
2. Kesitleri uygun filtre setleri ile bir floresan mikroskobu altında inceleyin.

Sitolojik Örnekler için FISH Prosedürü

Gerekli fakat Sağlanmamış Ayırıcılar

- FISH Ayırıcı Kiti (Cat No: CT-ACC101-20):
 - o 20X SSC Tuzu: OS'da saklayın, nemden uzak tutun
 - o DAPI Karşıt Boyası: karanlıkta 4°C'de saklayın
 - o NP-40: OS'da saklayın
- Pepsin (Liyofilize): -20°C veya daha düşük sıcaklıkta saklayın
- Hidroklorik asit (1N): OS'da saklayın
- Formaldehit (37%): OS'da saklayın
- 10X Fosfat ile Tamponlanmış Salin (PBS) Solüsyonu: OS'da saklayın
- Etanol (100%): OS'da saklayın

Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

1. 20X SSC Solüsyonu (pH 7,0)

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
SSC Tuzu	66 g	20X
dH ₂ O	250 ml	
TOPLAM	250 ml	

2. Pepsin Stok Solüsyonu

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
Pepsin, liyofilize	100 mg	100 mg/ml
dH ₂ O	1 ml	
TOPLAM	1 ml	

Not: Buz üzerinde saklayın. 20  l parçalar hazırlayın, -20  C'de saklayın.

3. Pepsin  alıřma Solüsyonu

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Pepsin Stok Sol�syonu	20 �l	0,02 �g/�l
dH ₂ O	99 ml	
TOPLAM	100 ml	

4. 2X SSC Solüsyonu

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
20X SSC Sol�syonu	10 ml	2X
dH ₂ O	90 ml	
TOPLAM	100 ml	

5. 1X PBS Solüsyonu

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
10X PBS Sol�syonu	10 ml	1X
dH ₂ O	90 ml	
TOPLAM	100 ml	

6. Formaldehit Solüsyonu

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
Formaldehit (37%)	2,7 ml	1%
10X PBS Sol�syonu	10 ml	1X
dH ₂ O	89 ml	
TOPLAM	100 ml	

7. 90% Etanol

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
Etanol (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOPLAM	100 ml	

8. 70% Etanol

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
Etanol (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOPLAM	100 ml	

9. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu 1

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
20X SSC Solüsyonu	2 ml	0,4X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	98 ml	
TOPLAM	100 ml	

10. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu 2

Ayır�a�lar	Eklenen Miktar	Son Konsantrasyon
20X SSC Solüsyonu	10 ml	2X
NP-40	100 µl	0,1%
dH ₂ O	90 ml	
TOPLAM	100 ml	

Sitoloji için FISH Prosedürü

Kesit Hazırlanması

1. Kesitleri 2 dakika boyunca OS'da 2x SSC solüsyonu içinde denkleştirin.
2. Kesitleri, 37 °C'de 1 – 10 dakika boyunca (örneklerin durumuna bağlı olarak) önceden ısıtılmış Pepsin Çalışma Solüsyonunda bekletin ve bir ışık mikroskobu altında hücrelerin durumunu gözleyin.
3. Kesitleri OS'da 1x PBS solüsyonu içinde 5 dakika boyunca yıkayın.
4. Fikse edildikten sonra kesitleri OS'da Formaldehit solüsyonu içinde 5 dakika boyunca bekletin.
5. Kesitleri OS'da 1x PBS solüsyonu içinde 5 dakika boyunca yıkayın.

Kesit Dehidrasyonu

1. Kesitleri 3 dakika boyunca %70 etanol içerisinde bekletin.
2. Kesitleri 3 dakika boyunca %90 etanol içerisinde bekletin.
3. Kesitleri 3 dakika boyunca %100 etanol içerisinde bekletin.
4. Kesitleri hava ile kurutun.

Probu Hazırlanması

1. . Probu OS'da 20-30 dakika boyunca önceden ısıtın.
2. Probu hafifçe girdap halinde döndürün ve yavaşlatın.

Ortak Denatürasyon & Hibridizasyon

1. Her hibridizasyon alanının üzerine probun 10 µL'sini uygulayın ve 22 mm x 22 mm lamel ile kapatın. Lastik kaplama ile lamel(ler)i kaplayın.
2. Prob ile kesitleri 5 dakika boyunca 72 °C'de birlikte denatüre edin.
3. Kesitleri önceden ısıtılmış ve nemlendirilmiş hibridizasyon odasına yerleştirin ve 37 °C'de gece boyunca (16 saat) inkübe edin

Hibridizasyon Sonrası Yıkama

1. Elmas uçlu kalem ile kesitlerin arkasında yer alan her hibridizasyon alanını işaretleyin.
2. Dikkatlice lastik kaplamayı çıkarın.
3. Lamel(ler)in gevşemesi için OS'da 2x SCC solüsyonu içine kesitleri batırın. Lamel(ler)i çekerek çıkarmayın.
4. Kesitleri, 72 °C'de önceden ısıtılmış Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu 1 içinde 1 dakika boyunca bekletin.
5. Kesitleri, OS'da 2 dakika boyunca Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu 2 içinde bekletin.
6. Kesitleri hava ile kurutun.

Görüntüleme

1. DAPI karşıt boyasını uygulayın ve kesitleri lameller ile kaplayın.
2. Kesitleri uygun filtre setleri ile bir floresan mikroskobu altında inceleyin.

Amniyotik Sıvı Örnekleri için FISH Prosedürü

Gerekli fakat Sağlanmamış Ayırıcılar

- FISH Ayırıcı Kiti:
 - o 20X SSC Tuzu: OS'da saklayın, nemden uzak tutun
 - o DAPI Karşıt Boyası: karanlıkta 4°C'de saklayın
 - o NP-40: OS'da saklayın
- Pepsin (Liyofilize): -20°C veya daha düşük sıcaklıkta saklayın
- Hidroklorik asit (1N): OS'da saklayın
- Formaldehit (37%): OS'da saklayın
- 10X PBS: OS'da saklayın
- Etanol (100%): OS'da saklayın

Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

1. 20X SSC Solüsyonu (pH 7,0)

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
SSC Tuzu	66 g	20X
dH ₂ O	250 ml	
TOPLAM	250 ml	

2. Pepsin Stok Solüsyonu

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
Pepsin, liyofilize	100 mg	100 mg/ml
dH ₂ O	1 ml	
TOPLAM	1 ml	

Not: Buz üzerinde saklayın. 20 µl parçalar hazırlayın, -20 °C'de saklayın.

3. Pepsin Çalışma Solüsyonu 1 (kültüre edilmemiş örnekler için)

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Pepsin Stok Solüsyonu	50 µl	0,05 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOPLAM	100 ml	

4. Pepsin Çalışma Solüsyonu 2 (kültüre edilmemiş örnekler için)

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Pepsin Stok Solüsyonu	20 µl	0,02 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOPLAM	100 ml	

5. 2X SSC Solüsyonu

Ayırıcılar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
------------	---------------	-------------------

20X SSC Solüsyonu	10 ml	2X
dH ₂ O	90 ml	
TOPLAM	100 ml	

6. 1X PBS Solüsyonu

Ayırarlar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
10X PBS Solüsyonu	10 ml	1X
dH ₂ O	90 ml	
TOPLAM	100 ml	

7. Formaldehit Solüsyonu

Ayırarlar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
Formaldehit (37%)	2,7 ml	1%
10X PBS Solüsyonu	10 ml	1X
dH ₂ O	89 ml	
TOPLAM	100 ml	

8. 90% Etanol

Ayırarlar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
Etanol (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOPLAM	100 ml	

9. 70% Etanol

Ayırarlar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
Etanol (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOPLAM	100 ml	

10. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu 1

Ayırarlar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
20X SSC Solüsyonu	2 ml	0,4X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	98 ml	
TOPLAM	100 ml	

11. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu 2

Ayırarlar	Eklene Miktar	Son Konsantrasyon
20X SSC Solüsyonu	10 ml	2X
NP-40	100 µl	0,1%
dH ₂ O	90 ml	
TOPLAM	100 ml	

Amniyositler için FISH PROSEDÜRÜ

Kesit Hazırlanması

Kültüre Edilmemiş Örnekler:

1. Kesitleri 37 °C'de 1 saat boyunca 2x SSC solüsyonu içinde denkleştirin.
2. Kesitleri, 37 °C'de 1-10 dakika boyunca (örneklerin durumuna bağlı olarak) önceden ısıtılmış Pepsin Çalışma Solüsyonu 1 içinde bekletin ve bir ışık mikroskobu altında hücrelerin durumunu gözleyin.
3. Kesitleri OS'da 1x PBS solüsyonu içinde 5 dakika boyunca yıkayın.
4. Fikse edildikten sonra kesitleri OS'da Formaldehit solüsyonu içinde 5 dakika boyunca bekletin.
5. Kesitleri OS'da 1x PBS solüsyonu içinde 5 dakika boyunca yıkayın.

Kültüre Edilmiş Örnekler:

1. Kesitleri OS'da 2 dakika boyunca 2x SSC solüsyonu içinde denkleştirin.
2. Kesitleri, 37 °C'de 1-10 dakika boyunca (örneklerin durumuna bağlı olarak) önceden ısıtılmış Pepsin Çalışma Solüsyonu 1 içinde bekletin ve bir ışık mikroskobu altında hücrelerin durumunu gözleyin.
3. Kesitleri OS'da 1x PBS solüsyonu içinde 5 dakika boyunca yıkayın.
4. Fikse edildikten sonra kesitleri OS'da Formaldehit solüsyonu içinde 5 dakika boyunca bekletin.
5. Kesitleri OS'da 1x PBS solüsyonu içinde 5 dakika boyunca yıkayın.

Kesit Dehidrasyonu

1. Kesitleri 3 dakika boyunca %70 etanol içerisinde bekletin.
2. Kesitleri 3 dakika boyunca %90 etanol içerisinde bekletin.
3. Kesitleri 3 dakika boyunca %100 etanol içerisinde bekletin.
4. Kesitleri hava ile kurutun.

Probu Hazırlanması

1. OS'da 20-30 dakika boyunca probu önceden ısıtın.
2. Probu hafifçe girdap halinde döndürün ve yavaşlatın.

Ortak Denatürasyon & Hibridizasyon

1. Her hibridizasyon alanının üzerine probun 10 µL'sini uygulayın ve 22 mm x 22 mm lamel ile kapatın. Lastik kaplama ile lamel(ler)i kaplayın.
2. Prob ile kesitleri 2 dakika boyunca 72 °C'de birlikte denatüre edin.
3. Kesitleri önceden ısıtılmış ve nemlendirilmiş hibridizasyon odasına yerleştirin ve 37 °C'de gece boyunca (16 saat) inkübe edin.

Hibridizasyon Sonrası Yıkama

1. Elmas uçlu kalem ile kesitlerin arkasında yer alan her hibridizasyon alanını işaretleyin.
2. Dikkatlice lastik kaplamayı çıkarın.
3. Lamel(ler)in gevşemesi için OS'da 2x SCC solüsyonu içine kesitleri batırın. Lamel(ler)i çekerek çıkarmayın.
4. Kesitleri, 72 °C'de önceden ısıtılmış Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu 1 içinde 1 dakika boyunca bekletin.
5. Kesitleri, OS'da 2 dakika boyunca Hibridizasyon Sonrası Yıkama Solüsyonu 2 içinde bekletin.
6. Kesitleri hava ile kurutun.

Görüntüleme

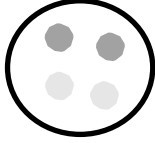
1. DAPI karşıt boyasını uygulayın ve lameller ile kesitleri kaplayın.
2. Kesitleri uygun filtre setleri ile bir floresan mikroskobu altında inceleyin.

SONUÇLARIN YORUMLANMASI

Amplifikasyon / Delesyon Probları için Sinyal Şekilleri

Normal Desenler

- 2 turuncu sinyal + 2 yeşil sinyal (2O2G)



Renk Anahtarı

- Turuncu sinyaller koyu gri noktalar olarak gösterilmiştir
- Yeşil sinyaller açık gri noktalar olarak gösterilmiştir

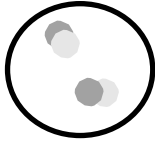
Anormal Desenler

- Başka herhangi bir şekil

Kırılma-ayrılma Probları için Sinyal Şekilleri

Normal Şekilleri

- Üst üste gelen 2 sarı-yeşil sinyaller(2OG)



Renk Anahtarı

- Turuncu sinyaller koyu gri noktalar olarak gösterilmiştir
- Yeşil sinyaller açık gri noktalar olarak gösterilmiştir
- Üst üste gelen turuncu ve yeşil sinyaller sarı olarak görülebilir.

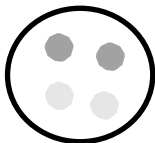
Anormal Şekiller

- Başka herhangi bir şekil

Füzyon / Translokasyon Probları için Sinyal Şekilleri

Normal Şekiller

- 2 turuncu sinyal + 2 yeşil sinyal (2O2G)



Renk Anahtarı

- Turuncu sinyaller koyu gri noktalar olarak gösterilmiştir.
- Yeşil sinyaller açık gri noktalar olarak gösterilmiştir

Anormal Şekiller

- Başka herhangi bir şekil. Üst üste gelen sinyaller (turuncu ve yeşil sinyallerin üst üste gelmesi) sarı sinyaller olarak görülebilir.

REFERANSLAR

1. Andersson S, et al. *Am J Pathol.* 175(5): 1831–1847 (2009).
2. Blackburn EH. *Nature.* 350(6319):569-73 (1991).
3. Cairns P, et al. *Cancer Res.* 57(22):4997-5000 (1997).
4. Chiarle R, et al. *Nat Rev Cancer.* 8(1):11-23 (2008).
5. Chu EC & Tarnawski AS. *Med Sci Monit.* 10(10):RA235-41 (2004).
6. Coussens L, et al. *Science.* 230(4730):1132-9 (1985).
7. Djulbegovic M, et al. *BMJ.* 341:c4543 (2010).
8. Druker BJ, et al. *N Engl J Med.* 355(23):2408-17 (2006).
9. Ernst T, et al. *Hematol Oncol Clin North Am.* 25(5):997-1008, v-vi (2011).
10. Foulkes WD, et al. *Mol Med.* 3(1):5-20 (1997).
11. Gonzalez S, et al. *Nature.* 440(7084):702-6 (2006).
12. Heselmeyer K, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(1):479-84 (1996).
13. Heselmeyer-Haddad K, et al. *Cancer Res.* 62(8):2365-9 (2002).
14. Heselmeyer-Haddad K, et al. *Am J Pathol.* 166(4): 1229–1238 (2005).
15. Kamb A, et al. *Science.* 264(5157):436-40 (1994).
16. Kwak EL, et al. *N Engl J Med.* 363(18):1693-703 (2010).
17. Krimpenfort P, et al. *Nature.* 413(6851):83-6 (2001).
18. Landstrom AP & Tefferi A. *Leuk Lymphoma.* 47(3):397-402 (2006).
19. Minoo P & Wang HY. *Int J Clin Exp Pathol.* 5(5):397-410 (2012).
20. Nowell PC, Hungerford DA. *J Natl Cancer Inst.* 25:85-109 (1960).
21. Pathmanathan N & Bilous AM. *Pathology.* 44(7):587-95 (2012).
22. Pauletti G, et al. *J Clin Oncol.* 18(21):3651-64 (2000).
23. Rowley JD. *Nature.* 243(5405):290-3 (1973).
24. Salido M, et al. *J Thorac Oncol.* 6(1):21-7 (2011).
25. Sasaki T, et al. *Eur J Cancer.* 46(10):1773-80 (2010).
26. Sharpless E & Chin L. *Oncogene.* 22(20):3092-8 (2003).
27. Shay JW & Bacchetti S. *Eur J Cancer.* 33(5):787-91 (1997).
28. Slamon DJ, et al. *Science.* 235(4785):177-82 (1987).
29. Steck PA, et al. *Nat Genet.* 1997 Apr;15(4):356-62 (1997).
30. Yoshimoto M, et al. *Br J Cancer.* 97(5):678–685 (2007).

Üretici



CytoTest Inc.
9430 Key West
Suite 210
Rockville, MD 20850
ABD

Tel: +1-202-688-1188
Faks: +1-301-296-6950
Email: sales@cytotest.com

Yetkili EC Temsilcisi



Obelis S.A.
Bd. General Wahis 53
1030 Brüksel
Belçika

Tel: +32-2-732-59-54
Faks: +32-2-732-60-03
Email: mail@obelis.net

Telif Hakkı © 2015 CytoTest, Inc.
Tüm Hakları Saklıdır.
www.cytotest.com