

primeFISH® 13q14 LS DC Prob Kiti

Ürün Kodu	: 17-001
Spektrum	: Kırmızı / Yeşil
Raf Ömrü	: 28.02.2020
Lot	: 180219-1
Saklama Şartı	: -20 °C
Kullanıma Hazır	: 10 test
İçerik	: 100 µl Probe ve 100 µl DAPI

Proben lokalizasyonu

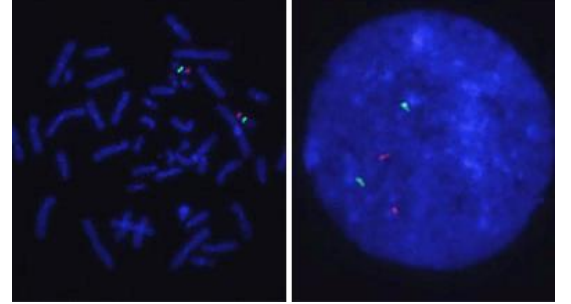
Kromozom 13q14 lokusu, insanda bir çok solid tümörde ve lösemilerde delesyona uğramaktadır. Bu nedenle, tümörel yapıların interfaz hücrelerinde ve metafaz plaklarında, 13q14 lokusunun durumunu ortaya koymak için 13q14.2-14.3 bölgesinin DNA FISH probu geliştirilmiştir.

Kromozom 13q14 bölgesine spesifik olarak dizayn edilmiş DNA FISH probu çift renktir. Kromozom 13q14 bölgesi kırmızı ve kromozomal yeniden düzenlenmeleri ve kromozom 13 kayıp ve kazanımlarını ortaya koymak için kromozom 13 telomer bölgesi yeşil ile işaretlenmiştir.

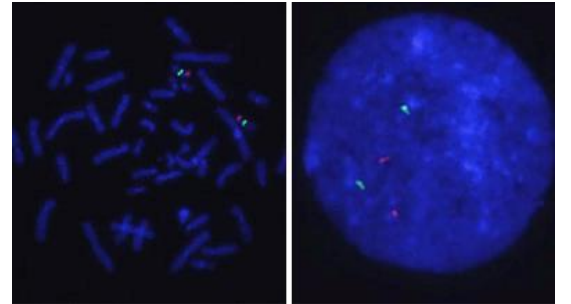
Ayrıca isteğe bağlı olarak (opsiyonel) kromozom 13' e ait kromozomal kayıp ve kazanımları kromozom yeniden düzenlemelerden ayırmak için kromozom 13/21 sentromerik bölgeleri turkuaz floresan molekülü ile işaretlenerek sunulmaktadır.

Sinyallerin incelenmesi ve yorumlanması

1. Uygun filtreli epifloresan mikroskopta preparat incelendiğinde, hem normal diploid interfaz hücrelerinde hem de metafaz kromozomlarında iki adet kırmızı ve iki adet yeşil sinyal gözlenmektedir (**Resim-1**).
2. Kromozom 13q14.2-q14.3 bölge delesyonunu, kromozom 13 monozomi, trizomi ve polizomilerinden ayırmak için mevcut kitte markır prob olarak kromozom 13qtel bölgesinde yeşil sinyal bulunmaktadır.
3. Kromozom 13q14.2-q14.3 bölgesinin yeniden düzenlenmelerini, kromozom 13'ün monozomi, trizomi ve polizomilerinden ayırmak için ikinci bir markır prob opsiyonel olarak kromozom 13/21 sentromer bölge probu (turkuaz sinyali) bulunmaktadır.
4. Kromozom 13q14.2-q14.3 bölgesinin delesyona uğradığı hücrelerde ise iki yeşil-ve bir kırmızı sinyal gözlenir. Bu yapı Kromozom 13q14.2-q14.3 bölgesinin heterozigot kaybını gösterir (**Resim-2**).
5. Kromozom 13q14.2-q14.3 bölgesinde yeniden düzenlenmelere girdiği hücrelerde varyant sinyal oluşumları gözlenebilir. Bu durumda ikinci markır prob sinyali (turkuaz sinyal) ile beraber incelenmelidir.



Resim-1. Metafaz ve interfaz nükleusunda iki adet kromozom 13q14.2-q14.3 bölgesine spesifik kırmızı ve iki adet kromozom 13qtel bölgesine spesifik yeşil sinyaller görülmektedir.



Resim-2. Metafaz ve interfaz nükleusunda kromozom 13q14.2-q14.3 bölgesinin delesyonunu gösteren sadece bir adet kırmızı ve iki adet yeşil sinyali kromozom 13qtel (yeşil sinyal) görülmektedir.

Not: Preparatta doku ve hücre artıkları istenmeyen spesifik olmayan, artifak sinyallere neden olabilir. Bu durumda, opsiyonel preparat hazırlama metodları kullanılarak informatik FISH sinyali alınmasına gidilmelidir.

Kit içeriği

DNA FISH probu, 5 test için 50 µl veya 10 test için 100 µl halinde hazırlanmıştır. Problar, hibridizasyon tamponu ile karıştırılmış ve kullanıma hazırdır. Her bir preparat için 10 µl prob karışımı ve 10 µl DAPI kullanılmaktadır. Kit içeriği aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tüp	5 test	10 test	Renk
Prob karışımı	50 µl	100 µl	Kırmızı kapak
DAPI Counterstain	50 µl	100 µl	Mavi kapak

Kitin ve preparatların saklama koşulları

Kit -20 °C' de saklanmalı ve direk ışıktan uzak tutulmalıdır. Aynı zamanda hibridizasyon yapılan preparat örnekleri de uzun süre saklanacaksa -20 °C de, kısa süreliğine ise 4 °C de tutulmalıdır. Hem prob, hem de hibridizasyon yapılmış preparatlar tekrar tekrar dondurulup çözülmemelidir.

Gerekli solüsyonlar (Kit içeriğinde bulunmaz)

- 20xSSC
- 2xSSC
- Etanol
- 1xPBS
- %0,4 Pepsin
- 1% Formaldehit
- 4xSSC-Tween20 (%0.5)
- İmmersiyon yağı

Gerekli cihazlar ve malzemeler (Kit içeriğinde bulunmaz)

Şale (En az 4 adet)	Su banyosu (2 adet) veya hot plate veya hibridizasyon fırını
Lam / Lamel (22x22mm)	Termometre
Pens	Mikropipet seti (10, 100, 200, 1000 µl)
Epifloresan mikroskop (uygun floresan filtreler)	Mikropipet uçları (10, 100, 200, 1000 µl)
Çeker ocak	Hibridizasyon kabı
Mikrosantrifüj	Mikrosantrifüj tüpleri
pH metre	

Uyarılar ve önlemler

- Kit, FISH çalışma eğitimi almış kişiler tarafından kullanılmalıdır.
- Kit sadece uygun laboratuvar ekipmanı ile kullanılmalıdır.
- Preparatlar ve preparatlarda fikse edilen hücre ve dokular, FISH çalışma kalite standartlarına uygun olmalıdır.
- Uygun olmayan saklama koşulları ve kullanma şartları, prob kalitesini hızlıca düşürür ve deneyde başarısızlığa neden olur.
- Çalışmalar, kitin protokolüne göre yapılmalıdır.
- Çalışma sırasında laboratuvar önlüğü ve eldiven kullanılmalıdır.
- Kitin içeriği direk deri temasından sakınılmalıdır.
- Kit atıkları laboratuvar kurallarına uygun atılmalıdır.
- Çalışılan örnekler potansiyel enfeksiyon kaynağı olarak düşünülmeli ve laboratuvar risk faktörleri için gerekli önlemler alınmalıdır.
- Raf ömrü geçen ürünler kullanılmaz.
- Tekrarlayan dondurma ve çözme işleminden, ayrıca uygun olmayan saklama koşullarından kaçınılmalıdır.

FISH protokolü

FISH çalışması temel olarak örneklerden preparat hazırlama, hazır kitin kullanılması ve elde edilen sonuçların yorumlanması basamaklarından oluşur.

Başarılı bir FISH analizi için probun kalitesi kadar incelenecek materyalin kalitesi ve bunun preparat şeklinde hazırlanmasına bağlıdır. Bu nedenle, FISH çalışmaları için farklı örneklerden farklı optimize preparat hazırlama protokolleri kullanılmalıdır.

Preparat hazırlanması

Taze olarak sitogenetik amaçlı hazırlanmış preparatlar kullanılır. Preparatlar sitogenetik amaçlara uygun hazırlandıktan sonra oda ısısında 1-2 saat veya 40-50 °C de 30 dakika tutulur. Daha sonra ışık mikroskobu altında, hücre sıklığı ve dağılımı dikkate alınarak lam üzerindeki hibridizasyon yapılacak bölge ya elmas yada cama yazar kalemle işaretlenir. Preparatın doku ve sitoplazma artıklarından arındırılmış olmasına dikkat edilmelidir.

Kullanılacak preparatta hücre nükleusları kirli, sitoplazmik ve doku artıkları varsa veya histolojik doku kesitleri kullanılıyorsa, aşağıdaki opsiyonel olarak verilen preparat hazırlama yöntemi kullanılabilir. Preparatlar parafin bloklardan hazırlanırsa lamlardan parafin uzaklaştırma metodu kullanılmalıdır.

Opsiyonel pepsin uygulaması

Preparatlarda sitoplazmik veya doku kalıntıları varsa veya kullanılan preparat histolojik bir preparat ise aşağıdaki protokol uygulanmalıdır:

- 25-30 ml 0,01 N HCl çözeltisi 37 °C' de ısıtılır.
- %0.4 hazırlanan (distile suda) pepsinden 12 µl alınır ve 25-30 ml 0,01 N HCl çözeltisi ile birleştirilir. Bu karışımda preparatlar 37 °C' de 10 dakika tutulur.

Not: Preparattaki doku ve sitoplazmik kalıntılar fazla ise bu süre uzatılabilir.

- Preparatlar sürenin sonunda oda ısısında 2xSSC' de veya 1xPBS' de 3 dk 3 kez yıkanır.
- Preparatlar, %1 lik formaldehitte, oda ısısında 5 dk tutulur.
- Tekrar 2xSSC veya 1xPBS' de 5 dk 3 kez yıkanır.
- Preparatlar %70, 80 ve 100 alkol serilerinde 3 dk tutulur.
- Preparatlar, havada 5-10 dk kurutulur ve FISH uygulamasına geçilir.

FISH probunun uygulanması, denatürasyonu ve hibridizasyonu

Aşağıdaki basamaklarda, hem FISH probu hem de hibridizasyona alınan preparatlar direk ışıkla temastan sakınılmalıdır.

1. DNA FISH probu, -20 °C' den alınarak kısaca vortekslenir ve mikrosantrifüjde kısaca santrifüj edilir.
2. Mikropipet ile 10 µl alınır ve 24x24 veya 22x22 mm' lik lamel üzerine konur.

3. Önceden hazırlanmış ve hibridizasyon bölgesi belirlenmiş preparata, üzerinde 10 µl prob olan lamel yerleştirilir.

Not: Bu aşamada hava kabarcığı kalmamasına ve lamın yönüne dikkat edilmelidir.

4. Lamlar metal bir tepsi üzerine yerleştirilerek önceden 65-70 °C' ye getirilmiş su banyosunda 6-8 dakika tutulur. Burada prob ve hedef DNA dizileri beraber denatüre edilir.

Not: Denatürasyon, hotplate, fırın vb nemsiz bir ortamda gerçekleştirildiğinde lamellerin etrafı solüsyonla kapatılarak prob karışımının buharlaşması önlenir.

5. Preparatlar, denatürasyon sonrasında önceden 37-42 °C' ye hazırlanmış su banyosunda veya nemli bir kap içinde 12-16 saat hibridizasyona bırakılır.

Yıkama ve zıt boyama

Hibridizasyon süresi tamamlandıktan sonra, preparatlara aşağıdaki yıkama ve boyama basamakları uygulanır ve ışıktan korunur.

Not: Hibridizasyon hangi ısıda yapıldı ise yıkama işlemleri de aynı ısıda gerçekleştirilmelidir.

1. Preparatlar, önceden 37-42 °C' ye ısıtılmış 2xSSC' de 5 dakika yıkanır. Lameller düşmemiş ise, lam üzerindeki doku ve hücrelere zarar vermeden ince uçlu bir pens ile uzaklaştırılır.
2. Birinci yıkama bir kez daha tekrarlanır.
3. Preparatlar, 37-42 °C' deki 2 ayrı 4xSSC-Tween20 içeren solüsyonda ayrı ayrı yıkanır.

Not: Gerekirse bu yıkama 3 kez tekrarlanabilir.

4. Preparatlar, oda ısındaki 4xSSC' den geçirildikten sonra, preparat üzerindeki sıvının uzaklaştırılması için 1-2 dakika dik pozisyonda tutulur.
5. Her bir hibridizasyon alanı için 22x22 veya 24x24 mm temiz, şeffaf lameller düz bir zemine konur ve üzerine 10 µl zıt boyama solüsyonu ilave edilir. Lamların hibridizasyona sokulan işaretli bölgesi, lamel üzerindeki zıt boyama solüsyonu üzerine yerleştirilir.

Preparatlar ışıktan korunarak ya bir kağıt veya alüminyum folyo ile sarılır veya ışık geçirmeyen bir kutu içine alınır. Preparatlar hemen incelenmeyecekse -20 °C' de, hemen incelenecekse kısa süreliğine 4 °C' de tutulabilir.

Preparatlar ışıktan korunarak ya bir kağıt veya alüminyum folyo ile sarılır veya ışık geçirmeyen bir kutu içine alınır. Preparatlar hemen incelenmeyecekse -20 °C' de, hemen incelenecekse kısa süreliğine 4 °C' de tutulabilir.

Mikroskopta inceleme

Preparat üzerinden fazla olan zıt boyama solüsyonu bir kağıt yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra, epifloresan mikroskopta 10x büyütme objektifinde ve DAPI filtrede tüm preparat incelenir. Sonrasında ise işaretli probun dalga boyuna göre yeşil, kırmızı ve çift renk (yeşil-kırmızı) filtreler ve 100x objektifte preparat analiz edilir.

Floresan mikroskop objektifleri ve floresan filtreler, kullanılan problemlerin floresan boylarına uygun olmalıdır. Mevcut kitte kullanılan boyların dalga boyları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Floresan boylarının dalga boyları.

Floresan Boya	Excitation (max)	Emission (max)
Kırmızı (Red)	573	602
Portakal (Orange)	544	572
Altın (Gold)	532	552
Yeşil (Green)	492	518
Turkuaz (Aqua)	432	472
DAPI	360	460