

Nr. Catalogo Prodotti.: FP-007

Per Diagnosi Clinica & Ricerca Scientifica

Kappa chain probe detection kit Manuale d'Istruzione

[Nome Prodotto] Kappa chain probe detection kit.

[Specifiche Confezionamento] 10 Tests/scatola

[Usi previsti]

Questo kit utilizza l'ibridazione fluorescente in situ per rilevare lo stato del gene kappa in vitro. I campioni per la rilevazione sono campioni di tessuto inclusi in paraffina da resezione chirurgica o biopsia di linfoma a cellule B. Questo kit è applicabile esclusivamente alla rilevazione dello stato di riarrangiamento del gene kappa e fornisce ai medici informazioni aggiuntive per la diagnosi. L'anomalia genetica più comune nel linfoma a cellule B è l'eterotopia e il riarrangiamento dei siti della catena pesante delle immunoglobuline (IGH). Inoltre, il 5-10% dei linfomi a cellule B presenta eterotopia e riarrangiamento della catena leggera delle immunoglobuline. Le catene leggere delle immunoglobuline includono la catena kappa (IGK) e la catena lambda (IGL), e le loro posizioni sui cromosomi umani sono rispettivamente 2p12 e 22q11. Studi attuali dimostrano che il riarrangiamento del gene IGK è un danno genetico acquisito e che le cellule del linfoma a cellule B si formano dalla proliferazione monoclonale di cellule B con anomalie genetiche, quindi si verificano alterazioni monoclonali. Questo riarrangiamento monoclonale del gene IGK può essere utilizzato come marcatore molecolare specifico per la diagnosi di linfoma a cellule B, e questa rilevazione clonale è utile per distinguere l'iperplasia reattiva policlonale dalla malattia proliferativa maligna. Pertanto, la rilevazione dello stato del gene IGK ha un significato guida per il trattamento e la prognosi del linfoma a cellule B.

[Principio di Rilevamento]

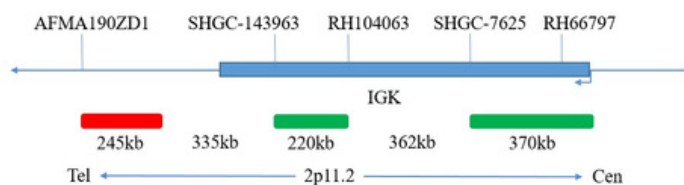
Questo kit si basa sulla tecnologia di ibridazione fluorescente in situ. Un nucleotide della sonda di acido nucleico è marcato con fluoresceina. Il gene target rilevato e la sonda di acido nucleico sono omologhi e complementari. Dopo denaturazione, annealing e rinaturazione, è possibile formare l'ibrido tra il gene target e la sonda di acido nucleico. Attraverso il sistema di rivelazione a fluorescenza, è possibile effettuare un'analisi qualitativa, quantitativa o relativa del posizionamento del gene target al microscopio. Questo kit utilizza una sonda arancione marcata con fluoresceina di rodamina (rho) e una sonda verde marcata con isotiocianato di fluoresceina (FITC). Le due sonde possono essere combinate al sito di rilevamento del target mediante ibridazione in situ. In condizioni normali (nessun riarrangiamento del gene kappa), queste due sonde si ibridano e si legano allo stesso gene, e vengono visualizzate come segnali verdi e arancioni vicini l'uno all'altro o come segnali gialli sovrapposti al microscopio a fluorescenza. In caso di riarrangiamento genico, i segnali verde e rosso vengono "interrotti" a causa della sostituzione dei partner di fusione ricombinanti e appaiono come segnali monocromatici separati a grande distanza. Il riarrangiamento del gene kappa nei tessuti dei pazienti con linfoma a cellule B è stato rilevato in vitro con questo metodo di ibridazione fluorescente in situ per frattura, che fornisce una base di riferimento per il trattamento, la prognosi e la terapia farmacologica dei pazienti con linfoma a cellule B.

[Composizione Prodotto]

Questo kit è composto da una soluzione di ibridazione della sonda kappa break apart come mostrato nella Tabella 1.

Tabella 1: Composizione Kit

Nome Componente	Specifiche	Quantità	Principali Componenti
kappa break apart probe	100µL/Tube	1	IGK Orange probe IGK Green probe



[Condizioni di Conservazione & Validità]

Conservare sigillato al riparo dalla luce a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$. Il prodotto è valido per 20 mesi. Per la conservazione a breve termine, conservare sigillato a $2-8^{\circ}\text{C}$ al buio entro 24 ore. Per la conservazione a lungo termine dopo l'apertura, conservare il coperchio sigillato a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ al riparo dalla luce. Il kit è trasportabile a temperature inferiori a 0°C .

[Strumenti Applicabili]

Sistema di imaging con microscopia a fluorescenza, comprensivo di microscopia a fluorescenza e set di filtri adatti per DAPI, verde e arancione.

[Requisiti Campione]

1. Tipo di campione applicabile: campione di tessuto di linfoma a cellule B incluso in paraffina.
2. Il campione deve essere fissato con una soluzione fissata in formalina neutra al 4% entro 1 ora dall'isolamento. Dopo la fissazione, il campione deve essere disidratato regolarmente e incluso in paraffina.
3. Lo spessore della sezione in paraffina influenzerà i risultati sperimentali e uno spessore di sezione di $4\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ è appropriato.
4. Per i campioni di tessuto inclusi in paraffina, devono essere selezionati blocchi di cera rappresentativi del tessuto tumorale e confermati mediante colorazione con elio endoteliale (HE).
5. Si raccomanda di selezionare campioni di tessuto inclusi in paraffina (entro 5 anni) con tempi di conservazione più brevi.

[Metodo di prova]

1. Reagenti Correlati

I seguenti reagenti sono necessari per l'esperimento ma non sono forniti in questo kit

① **20×SSC, pH 5.3±0.2**

Pesare 176 g di cloruro di sodio e 88 g di citrato di sodio, scioglierli in 800 ml di acqua deionizzata, regolare il pH a $5,3\pm 0,2$ a temperatura ambiente e completare fino a 1 l con acqua deionizzata. Sterilizzazione a vapore ad alta pressione, conservazione a $2-8^{\circ}\text{C}$; la soluzione ha una durata di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

② **2×SSC, pH 7.0±0.2**

Prelevare 100 ml del reagente 20×SSC sopra indicato, diluire con 800 ml di acqua deionizzata, mescolare, regolare il pH a $7,0\pm 0,2$ a temperatura ambiente, portare a 1 l con acqua deionizzata e conservare a $2-8^{\circ}\text{C}$. La durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

③ **Soluzione di etanolo: etanolo al 70%, etanolo all'85%**

Diluire 700 ml, 850 ml di etanolo con acqua deionizzata fino a ottenere 1 L. La durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

④ **Pepsina**

Soluzione di conservazione gastrica: pesare 5 g di pepsina in polvere secca e scioglierla in 100 ml di acqua distillata, agitare delicatamente fino a completa dissoluzione e conservare a -20°C , con una durata di conservazione di 6 mesi.

Soluzione di lavoro di pepsina (0,5%): sciogliere 5 ml di soluzione di conservazione di pepsina in 45 ml di soluzione di HCl (pH = 2), mescolare bene e preparare la soluzione per l'uso.

⑤ **Soluzione NP-40/0,4×SSC allo 0,3%, pH 7,0-7,5**

Prelevare 0,6 mL di NP-40 e 4 mL di 20×SSC, aggiungere 150 mL di acqua deionizzata, mescolare, regolare il pH a $7,0-7,5$ a temperatura ambiente, quindi aggiungere acqua deionizzata fino a raggiungere un volume di 200 mL. Conservare a $2-8^{\circ}\text{C}$ e la durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

volume of 200mL. Stored at $2-8^{\circ}\text{C}$, the shelf life is of 6 months. Discard if the reagent appears cloudy (turbid) or contaminated.

⑥ **Controcolorazione con diamidinil fenilindolo (DAPI)**

Utilizzare il colorante di contrasto anti-tempra DAPI disponibile in commercio.

2. Raccolta dei campioni e preparazione dei vetrini

Si suggerisce di selezionare campioni noti positivi e negativi come controllo esterno.

① Preparazione delle sezioni: le sezioni di tessuto fissate in formalina neutra e incluse in paraffina vengono posizionate su sezioni pulite.

② Cottura delle fette: posizionare le fette di tessuto sulla macchina per cottura a 65°C durante la notte per cuocere le fette e farle invecchiare.

③ Deceratura: immergere le sezioni di tessuto nella vasca di tintura contenente xilene per 10 minuti, ripetere l'operazione una volta e immergerle immediatamente in etanolo al 100% per 5 minuti.

- ④ Reidratazione: a temperatura ambiente, le sezioni di tessuto sono state immerse rispettivamente in etanolo al 100%, etanolo all'85% ed etanolo al 70% per 2 minuti, e poi immerse in acqua deionizzata per 3 minuti. Dopo aver estratto le sezioni, l'acqua in eccesso è stata assorbita lungo il tessuto con un tovagliolo di carta privo di lanugine.
- ⑤ Trattamento con acqua: immergere le sezioni di tessuto in acqua deionizzata per 30-40 minuti a bagnomaria a 95°C (l'acqua deionizzata deve essere preriscaldata a bagnomaria).
- ⑥ Lavaggio: a temperatura ambiente, le sezioni di tessuto sono state immerse in una soluzione SSC 2 ×, risciacquando due volte per 5 minuti ogni volta.
- ⑦ Trattamento con proteasi: immergere le sezioni di tessuto nella soluzione di proteasi preriscaldata a 37°C per 15~40 minuti (la soluzione di proteasi è pronta per l'uso e va gettata via dopo un utilizzo).
- ⑧ Lavaggio: a temperatura ambiente, le sezioni di tessuto sono state immerse in una soluzione SSC 2 ×, risciacquando due volte per 5 minuti ogni volta.
- ⑨ Disidratazione: le sezioni di tessuto sono state immerse rispettivamente in etanolo al 70%, etanolo all'85% e etanolo al 100% per 2 minuti, quindi essiccate naturalmente.

3. Denaturazione e ibridazione

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in una camera oscura.

- ① Estrarre la sonda e lasciarla a temperatura ambiente per 5 minuti. Mescolare e centrifugare brevemente. Prelevare una goccia da 10 µl dalla cella e depositarla nella zona di ibridazione, coprire immediatamente un'area del vetrino di 22 mm x 22 mm; distribuire uniformemente e senza bolle la sonda sotto l'area coperta dal vetrino e sigillare i bordi con della gomma (la sigillatura dei bordi deve essere accurata per evitare che la pellicola secca influenzi i risultati del test durante l'ibridazione).
- ② Posizionare i vetrini nello strumento di ibridazione, denaturare a 85 °C per 5 minuti (l'ibridizzatore deve essere preriscaldato a 85 °C) e ibridare a 42 °C per 2-16 ore.

4. Pulizia

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in una camera oscura.

- ① Estrarre i vetrini ibridati, rimuovere la gomma dal coprioggetto e immergere immediatamente i vetrini in una soluzione 2xSSC per 5 secondi, quindi rimuovere il coprioggetto.
- ② Posizionare i vetrini in un contenitore 2xSSC a temperatura ambiente per 1 minuto.
- ③ Estrarre i vetrini e immergerli in una soluzione preriscaldata a 68 °C di NP-40 allo 0,3%/0,4xSSC (Preparazione di NP-40 allo 0,3%/0,4xSSC: per la preparazione di 1 L, prelevare 3 mL di NP-40 e 20 mL di 20xSSC, sciogliere completamente, mescolare bene e utilizzare 1 M di NaOH per portare il pH a 7,2) e lavare per 2 minuti.
- ④ Rimuovere i vetrini e immergerli in acqua deionizzata preriscaldata a 37°C, lavare per 1 minuto e asciugare i vetrini naturalmente al buio.

5. Controcolorazione

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura:

10 µl di agente di controcolorazione DAPI sono stati versati sull'area di ibridazione e le sezioni sono state immediatamente coperte. Dopo essere state lasciate al buio per 10-20 minuti, le sezioni sono state osservate con un filtro adatto al microscopio a fluorescenza.

6. Osservazione dei risultati FISH

Le sezioni controcolorate sono state poste al microscopio a fluorescenza e, sotto luce naturale, sono state inizialmente colorate con un obiettivo a basso ingrandimento (10x). La regione cellulare del linfoma a cellule B è stata confermata nella figura sottostante; ingrandite a 40x, sotto l'obiettivo, individuate una posizione in cui le cellule siano distribuite uniformemente; con l'obiettivo ad alto ingrandimento (60x, 100x). Devono essere selezionate le cellule con dimensioni nucleari uniformi, confine nucleare completo, colorazione DAPI uniforme, assenza di nuclei sovrapposti e segnali chiari. Almeno 100 cellule tumorali devono essere selezionate casualmente per contare i segnali rossi e verdi nei nuclei.

[Valore di giudizio positivo o intervallo di riferimento]

1. Classificazione e conteggio dei segnali

- ① Segnale cellulare normale: sono presenti 2 segnali gialli fusi in un singolo nucleo interfase.
- ② Segnale cellulare anomalo: sono presenti un segnale rosso-arancio, un segnale verde e un segnale giallo nel nucleo di una singola interfase.

Nota: poiché la sonda verde contrassegna due sezioni, il segnale verde può essere visualizzato come una coppia di punti di segnale.

Vengono contate casualmente 100 cellule e viene contato il numero di cellule segnale normali e anomale. Ogni cellula viene contata una volta. Vengono contate solo le cellule con segnali di ibridazione (entrambi i segnali colorati). Le cellule senza segnale o con un solo segnale colorato non vengono contate. Le cellule con segnale debole o troppo diffuso non vengono contate.

2. Giudizio sui risultati FISH

Per determinare l'anomalia del risultato del rilevamento, è necessario stabilire una soglia di anomalia

① Determinazione della soglia anomala

- 1) Si suggerisce di selezionare 20 campioni di tessuto da pazienti con linfoma non a cellule B come controllo negativo.
- 2) I vetrini sono stati preparati utilizzando i metodi e i passaggi sopra descritti per gli esperimenti FISH.
- 3) Determinazione della soglia anomala: analizzare 100 cellule per campione, contare la percentuale di segnali anomali in ciascun gruppo di sonde e calcolare il valore medio e la deviazione standard della percentuale di cellule che mostrano segnali anomali. La soglia anomala è definita come valore medio + 3 × deviazione standard.

Soglia anomala = media (m) + 3 × deviazione standard (SD)

Esempio: Tabella 2: campioni di tessuto da 20 pazienti con linfoma non a cellule B sono stati selezionati come controlli negativi per la rilevazione FISH.

Tabella 2: Stabilimento della soglia anomala

No.	Cella anormale (%)
Campione 1	5
Campione 2	3
-----	-----
Campione 20	4
media	3
SD	0.3
soglia	(Soglia anormale = media (m) + 3 × SD)3.9

② Giudizio sul risultato:

Se il valore rilevato del numero di cellule che mostrano la modalità di segnale anomala è maggiore della soglia anomala, il risultato viene considerato positivo; se il valore rilevato del numero di cellule che mostrano la modalità di segnale anomala è inferiore alla soglia anomala, il risultato viene considerato negativo; se il valore di rilevamento del numero di cellule in modalità di segnale anomala è uguale alla soglia anomala, aumentare il numero di cellule nel campione di osservazione e contare 200 cellule per valutare il risultato finale.

[Limitazioni dei metodi di ispezione]

Questo kit è utilizzato per la resezione chirurgica del linfoma a cellule B o per la biopsia di campioni di tessuto inclusi in paraffina e non è raccomandato per altri tessuti. La capacità di rilevamento di campioni di tessuto in paraffina conservati per un periodo di tempo troppo lungo non può essere valutata secondo queste istruzioni. Deve essere utilizzato secondo le procedure fornite in questo manuale. Qualsiasi modifica alle procedure può modificare i risultati dell'ispezione. Questo kit rileva solo lo stato del gene kappa e non può essere utilizzato come unica base per il trattamento, la valutazione prognostica o altre attività cliniche di pazienti affetti da linfoma a cellule B. Deve essere valutato in modo completo sulla base dell'anamnesi e di altri risultati diagnostici.

[Indice di prestazione del prodotto]

1. Intensità del segnale di fluorescenza: dopo che la sonda è stata efficacemente ibridata con il campione di cariotipo, il segnale di fluorescenza riconoscibile a occhio nudo deve essere emesso al microscopio a fluorescenza.
2. Sensibilità: sono stati analizzati 100 cromosomi 2 di 50 cellule in metafase e almeno 98 cromosomi 2 hanno mostrato un segnale di fluorescenza rosso-arancio e un segnale di fluorescenza verde.
3. Specificità: sono stati analizzati 100 cromosomi 2 di 50 cellule in metafase e almeno 98 cromosomi 2 hanno mostrato un segnale di fluorescenza specifico rosso-arancio e un segnale di fluorescenza specifico verde nella regione bersaglio.

[Precauzioni]

1. Leggere attentamente questo manuale prima di eseguire il test. Il personale addetto al test deve ricevere una formazione tecnica professionale. Il personale addetto al conteggio dei segnali deve essere in grado di osservare e distinguere i segnali arancione, rosso e verde.
2. Quando si analizzano campioni clinici, se è difficile contare i segnali di ibridazione e i campioni non sono sufficienti per ripetere il test, il test non fornirà alcun risultato. Anche in questo caso, se la quantità di cellule è insufficiente per l'analisi, il test non fornirà risultati.
3. La formamide e l'agente di controcolorazione DAPI utilizzati in questo esperimento presentano potenziale tossicità o cancerogenicità, pertanto è necessario utilizzarli sotto cappa aspirante e indossare maschere e guanti per evitare il contatto diretto.
4. I risultati di questo kit saranno influenzati da vari fattori del campione stesso e limitati dal tempo di digestione enzimatica, dalla temperatura e dal tempo di ibridazione, dall'ambiente operativo e dalle limitazioni dell'attuale tecnologia di biologia molecolare, che potrebbero portare a risultati errati per il gene del riarrangiamento kappa. L'utente deve comprendere i potenziali errori e i limiti di accuratezza che possono presentarsi nel processo di rilevamento.
5. Tutte le sostanze chimiche sono potenzialmente pericolose. Evitare il contatto diretto. I kit usati sono rifiuti clinici e devono essere smaltiti correttamente.

[Referenze]

- [1]. José I. Martín-Subero ‡, Lana Harder ‡, Gesk S, et al. Interphase FISH assays for the detection of translocations with breakpoints in immunoglobulin light chain loci[J]. International Journal of Cancer, 2002, 98(3):470-474.
- [2]. Poulsen T S, Silahdaroglu A N, Gisselø C G, et al. Detection of illegitimate rearrangements within the immunoglobulin light chain loci in B cell malignancies using end sequenced probes[J]. Leukemia, 2002, 16(10):2148.
- [3]. Kornblau S M, Goodacre A, Cabanillas F. Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature[J]. Hematological Oncology, 1991, 9(2):63-78.

[Informazioni di base]

Nome del Registrante /Produttore: Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd.

Indirizzo: Floor 1-4, Building #8, Optics Valley Precision Medicine Industry Base Phase I, #9 Gaokeyuan 3rd Road, East Lake High-Tech Zone, Wuhan City, Hubei Province, People's Republic of China.

Tel#: +86(027)8757-0662 E-mail: cs@healthcare-biotech.com | Website: www.healthcare-biotech.com

[Data Approvazione Manuale & Data Revisione]

V1. 0: Data approvazione: 02 Novembre, 2018.

V1. 1: Data Revisione: 07 Dicembre, 2021.



Via dei Colli S.Paolo 3/D – 00072 ARICCIA (RM)- Italy

Tel.: (+39)0693955058 – Fax.: (+39)0693955059

E-mail: servizioclienti@resnovaweb.it – PEC mail: resnova@pec.it

Per invio ordini: ordini@resnovaweb.it – Web site: www.resnovaweb.com