

**Příloha 1: Pracovní postup - Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)
(PP-UBLG-50-007)**



Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2
IČ 00064165, tel. 224961111
Ústav biologie a lékařské genetiky VFN a 1. LF UK
128 08 Praha 2, Albertov 4
www.vfn.cz

PP-UBLG-50-007

Strana 1 z 7

Verze 3

Pracovní postup **Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

Obsah:

1. Účel a oblast platnosti dokumentu	2
2. Pojmy a zkratky	2
3. Odpovědnosti a pravomoci.....	2
4. Chemikálie, reagentie a spotřební materiál	2
4.1 Chemikálie a reagentie	2
4.2 Spotřební materiál	2
5. Přístroje a pomocná zařízení	2
5.1 Pomocná zařízení	2
5.2 Přístroje	2
6. Postup (popis činností).....	3
6.1 Příprava a uchování roztoků	3
6.2 Biologický materiál pro vyšetření.....	4
6.3 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace – vlastní postup	4
6.4 Odečet výsledků zkoušky.....	5
7. Související dokumenty	6
8. Seznam použité a doporučené literatury	6
9. Záznam o změnách v dokumentu	6
10. Záznam o revizi dokumentu.....	6
11. Rozdělovník	7
12. Přílohy	7

Zpracoval: MUDr. Romana Mihalová RNDr. Luděk Záveský, Ph.D.	Výtisk č.:	Schválil: Mgr. Mimoza Janashia, CSc.
Odborný garant: MUDr. Romana Mihalová	První vydání: dne: 19. 1. 2010	dne: 23. 9. 2015



Pracovní postup Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

PP-UBLG-50-007
Strana 2 z 7
Verze 3

1. Účel a oblast platnosti dokumentu

Pracovní postup je závazný pro všechny pracovníky cytogenetické laboratoře Ústavu biologie a lékařské genetiky VFN a 1. LF UK. Dokument definuje pracovní postupy pro použití metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) v cílené prenatalní nebo postnatální diagnostice.

2. Pojmy a zkratky

FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

DNA – deoxyribonukleová kyselina

LSI – lokus specifická fluorescenčně značená sonda

CEP – centromerická fluorescenčně značená sonda

WCP – celochromosomová (malovací) sonda

DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindol (barvivo pro nespecifické fluorescenční značení DNA)

1. LF UK – 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

UBLG – Ústav biologie a lékařské genetiky

VFN – Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

3. Odpovědnosti a pravomoci

Pracovníci pověřeni vedením laboratoře a proškolení k provádění zkoušky.

4. Chemikálie, reagentie a spotřební materiál

4.1 CHEMIKÁLIE A REAGENCIE

Reagentie z komerčně dodávaných souprav (sondy, hybridizační pufry, DAPI), ethanol, Igepal, destilovaná voda, injekční voda.

4.2 SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Odběrové jehly a stříkačky na jedno použití, plastové zkumavky, jednorázové plastové Pasteurovy pipety, jednorázové špičky pro ruční automatické mikropipety, mikrozukavky, podložní skla, krycí skla, skleněné lahvičky, odměrné válce, alobal, parafilm, buničitá vata, vyšetřovací rukavice, lak na nehty, rubber cement (lepidlo).

5. Přístroje a pomocná zařízení

5.1 POMOCNÁ ZAŘÍZENÍ

Chladničky, mrazáky, stojánky, odměrné válce, zábrusové lahve, kyvety, diamantová tužka, krabička na hybridizaci („hybridizační komůrka“), pinzety, 50-ml falkonky, plováky, popisovače, mikrozukavky.

5.2 PŘÍSTROJE

topná deska

termostat



Pracovní postup Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

PP-UBLG-50-007
Strana 3 z 7
Verze 3

vodní lázeň
mikrocentrifuga
vortex
ruční mikropipety
teploměry
stopky
fluorescenční mikroskop
pH metr

6. Postup (popis činností)

6.1 PŘÍPRAVA A UCHOVÁNÍ ROZTOKŮ

Voda pro injekce (Aqua pro injectione) – komerčně dodávaný roztok, uchovávat při pokojové teplotě

100% ethanol – absolutní EtOH, komerčně dodávaný roztok, uchovávat při pokojové teplotě

70% ethanol – 100% ethanol + voda pro injekce 7:3, uchovávat při pokojové teplotě

85% ethanol – 100% ethanol + voda pro injekce 17:3, uchovávat při pokojové teplotě

Sondy – komerčně dodávaný roztok (výrobci např. Cytocell, Abbott, Kreatech), uchovávat při -20 °C nebo +2 až +8 °C (dle návodu výrobce), dodávaný k přímému použití („ready to use“) nebo k použití po smísení s hybridizačním pufrem

Hybridizační pufr – komerčně dodávaný roztok (obvykle součástí soupravy spolu se sondou), uchovávat při -20 °C

DAPI II Counterstain (125 ng/ml) – komerčně dodávaný roztok (např. Cytocell), uchovávat při -20 °C

1M NaOH (roztok čerstvě připravený, lékárna VFN, uchovávat při pokojové teplotě)

1M HCl (roztok čerstvě připravený, lékárna VFN, uchovávat při pokojové teplotě)

20x SSC, pH 5,3 (připravený roztok, lékárna VFN, uchovávat při pokojové teplotě)

Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) – komerčně dodávaný roztok, uchovávat při pokojové teplotě

Odmývací roztok I – 0,4x SSC / 0,3% Igepal CA-630

– 2 ml 20x SSC pH 5,3

– 300 µl Igepal CA-630

– 95 ml vody pro injekce,

doplnit do 100 ml vody, upravit pH 7-7,5; uchovávat při pokojové teplotě maximálně 6 měsíců.

Odmývací roztok II – 2x SSC / 0,1% Igepal CA-630

– 10 ml 20x SSC pH 5,3



Pracovní postup Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

PP-UBLG-50-007
Strana 4 z 7
Verze 3

- 100 µl Igepal CA-630
 - 85 ml vody pro injekce
- doplnit do 100 ml vody, pH 7,0; uchovávat při pokojové teplotě maximálně 6 měsíců.

6.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL PRO VYŠETŘENÍ

Zkoušeným materiálem je vzorek buněčné suspenze kultivované periferní nebo fetální krve, případně kultivované plodové vody nebo choriových klků.

1. Vzorek suspenze odebrat při cytogenetickém zpracování – viz [PP-UBLG-50-012](#) Cytogenetické zpracování kultivovaných buněk fetální a periferní krve.
2. Ruční mikropipetou nakapat cca 40-60 µl suspenze na suché namražené podložní sklo, nechat zaschnout.
3. Připravené sklo uchovávat při pokojové teplotě max. 24 hodin, delší dobu při -20 °C.
4. Zapsat základní údaje o pacientovi a typu vyšetření do Knihy pacientů/klientů – FISH a do NIS MEDEA. Vedení zdravotnické dokumentace – viz Léčebný řád VFN ([RD-VFN-01](#)).

6.3 FLUORESCENČNÍ *IN SITU* HYBRIDIZACE – VLASTNÍ POSTUP

Pozor: Po celou dobu práce se sondou a následně s připraveným sklem pracovat za minimální světelné expozice (pro uchování intenzity fluorescence). Vlastní postup probíhá při dodržení konkrétního návodu výrobce pro jednotlivý typ sondy, pokud není na základě předchozí optimalizace a tohoto pracovního postupu nebo validace dokumentované v příslušném validačním protokolu stanoveno jinak. Veškeré modifikace pracovního postupu musí být prověřeny tak, aby negativně neovlivňovaly kvalitu poskytovaného vyšetření. Záznamová dokumentace o provedení metody FISH je vedena formou formuláře [F-UBLG-50-013](#) Záznamy o provedení metody FISH.

Denaturace a hybridizace

1. Nahřát topnou desku na 75 ± 1 °C.
2. V případě použití skel z -20 °C (viz 6.2.3) nechat tyto temperovat při pokojové teplotě 5-10 minut.
3. Provést dehydrataci skel v alkoholové řadě: 70%, 85% a 100% ethanol, 1,5-2 minuty v každém, při pokojové teplotě.
4. Připravit sondu do označené mikrozkušavky (v případě přípravy ze sondy a hybridizačního pufru), případně aplikovat přímo na krycí sklo (v případě sondy pro přímé použití).
5. Nanést mikropipetou 2,5-10 µl sondy na připravené podložní sklo se vzorkem, překrýt krycím sklem odpovídajícího rozměru (15 mm x 15 mm až 22 mm x 22 mm). Např. pro 2,5 µl sondy použít krycí sklo 15 mm x 15 mm.
6. Krycí sklo překrýt po obvodu rubber cementem.



Pracovní postup Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

PP-UBLG-50-007
Strana 5 z 7
Verze 3

7. Kodenaturace sondy a DNA vzorku. Připravené sklo se vzorkem a sondou umístit na nahřátou topnou desku. Doba kodenaturace je určena výrobcem podle typu sondy, obvykle CEP 1,5-2 minuty; LSI a WCP 2-5 minut.
8. Hybridizace. Sklo umístit do vlhké hybridizační komůrky (krabička obsahující vlhkou buničinu) a hybridizovat v termostatu při 37 ± 1 °C podle typu použité sondy: CEP minimálně 60 minut až přes noc, LSI nebo WCP minimálně 6 hodin, nejlépe přes noc.

Odmytí

Po ukončení hybridizace následuje odmytí přebytečné sondy.

1. Nahřát vodní lázeň na 73 ± 1 °C.
2. Nalít do falkonky cca 30 ml odmývacího roztoku I a nahřát v lázni na 73 ± 1 °C (použit plovák).
3. Do druhé falkonky nalít cca 30 ml odmývacího roztoku II, obalit ji alobalem a postavit do stojánku na pracovní desku.
4. Obvod krycího skla označit z rubové strany diamantovou tužkou, odstranit zaschlý rubber cement a krycí sklo opatrně stáhnout pinzetou.
5. Sklo ponořit do odmývacího roztoku I v první falkonce na cca 2 minuty v předehřáté vodní lázni.
6. Sklo přemístit do odmývacího roztoku II ve druhé falkonce na 0,5-1 minutu při pokojové teplotě.
7. Sklo nechat uschnout ve tmě.
8. Na označené místo aplikovat 5,5-10 µl DAPI pod krycí sklo 18 x 18 mm až 22 x 22 mm.
9. Krycí sklo upevnit na místě po obvodu lakem na nehty.
10. Připravený FISH preparát uchovávat v lednici.

6.4 ODEČET VÝSLEDKŮ ZKOUŠKY

Připravené preparáty jsou analyzovány ve fluorescenčním mikroskopu. Při odečtu výsledků zkoušky se postupuje podle návodu, který je součástí komerční vyšetřovací soupravy. Jedná se o počítání fluorescenčních signálů v jádrech nebo na chromosomech a identifikaci chromosomálních přestaveb. Při vyšetření mozaicismu gonosomů se hodnotí obvykle 200 intaktních jader. U lokus specifických sond je vyšetření kvalitativní a závěr je stanoven na základě reprezentativního počtu mitóz v závislosti na kvalitě preparátu. Do protokolu pro záznam hodnocení FISH (příloha PP-UBLG-50-007 p1) označeného jménem pacienta a číslem vzorku jsou zapisovány jednotlivé nálezy. Na závěr je stanoven výsledek vyšetření se zápisem podle mezinárodní nomenklatury – International System for Human Cytogenetic Nomenclature – ISCN 2013, který je též zaznamenán v NIS MEDEA.



Pracovní postup Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

PP-UBLG-50-007
Strana 6 z 7
Verze 3

7. Související dokumenty

<u>RD-VFN-01</u>	Léčebný řád
<u>RD-VFN-11</u>	Řád používání informačních systémů
<u>SOP-UBLG-50-002</u>	Cytogenetické stanovení karyotypu z fetální a periferní krve
<u>PP-UBLG-50-012</u>	Cytogenetické zpracování kultivovaných buněk fetální a periferní krve
<u>F-UBLG-50-013</u>	Záznamy o provedení metody FISH.

Manuály jednotlivých diagnostických souprav (externí dokumentace).

8. Seznam použité a doporučené literatury

ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Eds. Schaffer LG, McGowan-Jordan J.; Schmid M. Vydavatel: S. Karger, 2013.

9. Záznam o změnách v dokumentu

Datum změny	Kapitola / strana č.	Popis změny	Změnu provedl
23.9.2015	k. 6.3/s. 4	Změna formy záznamové dokumentace	MUDr. Mihalová
23.9.2015	k. 7/s. 6	Doplněna souvisejícího dokumentu F-UBLG-50-013	MUDr. Mihalová

Záznam o revizi dokumentu

Datum revize	Jméno/podpis
27.9.2013	RNDr. Luděk Záveský, Ph.D. MUDr. Romana Mihalová
23.9.2014	MUDr. Romana Mihalová
23.9.2015	Provedeny změny – vytvořena verze 3 MUDr. Romana Mihalová



Pracovní postup Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

PP-UBLG-50-007
Strana 7 z 7
Verze 3

Rozdělovník

Elektronický dokument:

Tento dokument je k dispozici pracovníkům ÚBLG v elektronické podobě na DMS3 serveru na Intranetu VFN po dobu platnosti dokumentu.

Tištěný dokument:

název	umístění	doba uchování
Výtisk č. 1	správce dokumentace	5 let po skončení platnosti
Výtisk č. 2	řízená dokumentace cytogenetické laboratoře	po dobu platnosti

10. Přílohy

Příloha 1 – protokol pro záznam hodnocení FISH (PP-UBLG-50-007 p1)

Příloha 2: Kompletní výsledky molekulárně cytogenetické části projektu.

Přehled případů vyšetřených v rámci molekulárně cytogenetické části našeho projektu.

Ve sloupci primární BAC je uveden hlavní typ BAC-sondy, která byla pro vyšetření daného případu použita (viz sekce Metodika), ve sloupci C-banding jsou pomocí symbolu X vyznačeny případy, kdy bylo (v indikující laboratoři, nikoliv přímo námi) prováděno i vyšetření C-pruhováním. Ve sloupci klasifikace je uvedena pravděpodobná klasifikace dle Kosaykova et al., 2013, u případů označených v tomto sloupci hvězdičkou () byla klasifikace případu potvrzena přímo profesorem Liehrem. U případů paracentrické inverze nebylo možné případy blíže klasifikovat (onačeny jako NA).*

ID	F/M	Věk	Diagnóza	Karyotyp dle G-pruhování	Primární BAC	C-banding	Klasifikace	Poznámky
1	F	27	Darování pohlavních buněk	46,XX,dup(9)(q12q21.11)	RP11-211N8	X	dup(9) var1 (*)	Hodnocení případu dle prof. Liehra: 46,XX,der(9)(pter->q21.11::q12->qter)
2	F	25	Reprodukční porucha	46,XX,9qh-	RP11-45O22		9qh-	
3	F	21	Darování pohlavních buněk	46,XX,dup(9)(p12p12)	RP11-211N8	X	9ph+ 9cen- (*)	Hodnocení případu dle prof. Liehra: 46,XX,9cen-,9ph+
4	F	22	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1 9qh- (*)	Hodnocení případu dle prof. Liehra: 46,XX,inv(9)(p12q21.11)
5	F	25	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8	X	inv(9) var1 9qh- (*)	Hodnocení případu dle prof. Liehra: 46,XX,inv(9)(p12q21.11),9qh-
6	F	25	Darování pohlavních buněk	46,XX,dup(9)(p12p12),inv(9)(p12q13)	RP11-211N8	X	9ph+ inv(9) var1	
7	F	34	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(q12q31.1)	RP11-211N8		NA	Paracentrická inverze, hodnoceno v rámci rutinní diagnostiky, potvrzen zlom v oblasti 9q12
8	M	41	Reprodukční porucha	46,XY,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
9	F	33	Darování pohlavních buněk	46,XX,9qh-	RP11-211N8		9qh-	
10	M	0	Vrozené vady	46,XX,inv(9)(p13q21)	RP11-211N8		inv(9) var1	Prenatální diagnostika (FK), orofaciální rozštěp, negativní array-CGH, na žádost těhotné bylo těhotenství ukončeno.

ID	F/M	Věk	Diagnóza	Karyotyp dle G-pruhování	Primární BAC	C-banding	Klasifikace	Poznámky
11	F	32	Ověření karyotypu	46,XX,inv(9)(p13q21)	RP11-211N8		inv(9) var1	Matka od případu 10
12	M	1	Vrozené vady	46,XY,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var2	
13	F	28	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
14	F	18	Darování pohlavních buněk	46,XX,9qh+	RP11-45O22		9qh+	
15	F	31	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
16	F	32	Dobrovolník	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var2	
17	F	29	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var2	
18	M	30	Reprodukční porucha	46,XY,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
19	F	24	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13),9qh+	RP11-211N8		inv(9) var1, 9qh+	
20	F	28	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var2	
21	F	33	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
22	M	32	Reprodukční porucha	46,XY,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
23	F	38	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
24	F	34	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var2	
25	F	32	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
26	F	27	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
27	F	34	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	

ID	F/M	Věk	Diagnóza	Karyotyp dle G-pruhování	Primární BAC	C-banding	Klasifikace	Poznámky
28	F	28	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
29	F	24	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
30	F	34	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
31	F	24	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p11.2p24.1)	RP11-211N8		9qh+ (*)	Hodnocení případu dle prof. Liehra: 46,XX,inv(9)(p13p24.1),9qh+ Pozice zlomu upřesněna do pruhu 9p13, druhý homolog hodnocen jako 9qh+ Hodnoceno v rámci rutinní diagnostiky
32	M	0	Věk maty	46,XY,dic(9)(pter->q13::p12->qter)	RP11-211N8		dic(9) var1	AMC, negativní array-CGH, narozen zdravý chlapec, matka odmítla postnatální odběr Hodnoceno v rámci rutinní diagnostiky
33	F	37	Ověření karyotypu	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var 1	Matka od případu 32 Hodnoceno v rámci rutinní diagnostiky
34	F	32	Darování pohlavních buněk	46,XX,9qh+	RP11-45O22		9qh+	
35	F	20	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
36	F	26	Reprodukční porucha	46,XX,9qh-	RP11-211N8		9qh-	
37	F	21	Darování pohlavních buněk	46,XX,9qh-	RP11-211N8		9qh-	
38	M	36	Darování pohlavních buněk	46,XY,9qh+	RP11-211N8		9qh+	
39	F	23	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
40	F	24	Darování pohlavních buněk	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
41	M	1	Vrozené vady	47,YYY,inv(9)(p12p24)	RP11-45O22		NA	Provedené array-CGH bez nálezu na chromozomu 9 (paracentrická inverze) Hodnoceno v rámci rutinní diagnostiky
42	M	25	Reprodukční porucha	46,XY,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	

ID	F/M	Věk	Diagnóza	Karyotyp dle G-pruhování	Primární BAC	C-banding	Klasifikace	Poznámky
43	F	33	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var2	
44	F	38	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
45	F	38	Reprodukční porucha	46,XX,9qh+	RP11-211N8		9qh+	
46	F	43	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
47	F	36	Ověření karyotypu	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	
48	F	36	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var2	
49	F	33	Reprodukční porucha	46,XX,inv(9)(p12q13),t(15;22)(q26.1;p12)	RP11-45O22		inv(9) var1	
50	M	29	Reprodukční porucha	46,XY,inv(9)(p12q13)	RP11-45O22		inv(9) var1	
51	M	37	Reprodukční porucha	46,XY,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	Hodnoceno v rámci rutinní diagnostiky
52	F	57	Ověření karyotypu	46,XX,inv(9)(p12q13)	RP11-211N8		inv(9) var1	Matka od případu 51 Hodnoceno v rámci rutinní diagnostiky