

FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON

Sağlık Teknikeri
Hande ÇOLAKOĞLU



Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji AD



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



SIVI ve DOKULARIN FISH UYGULAMASI ÖNCESİ HAZIRLIK İŞLEMLERİ



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



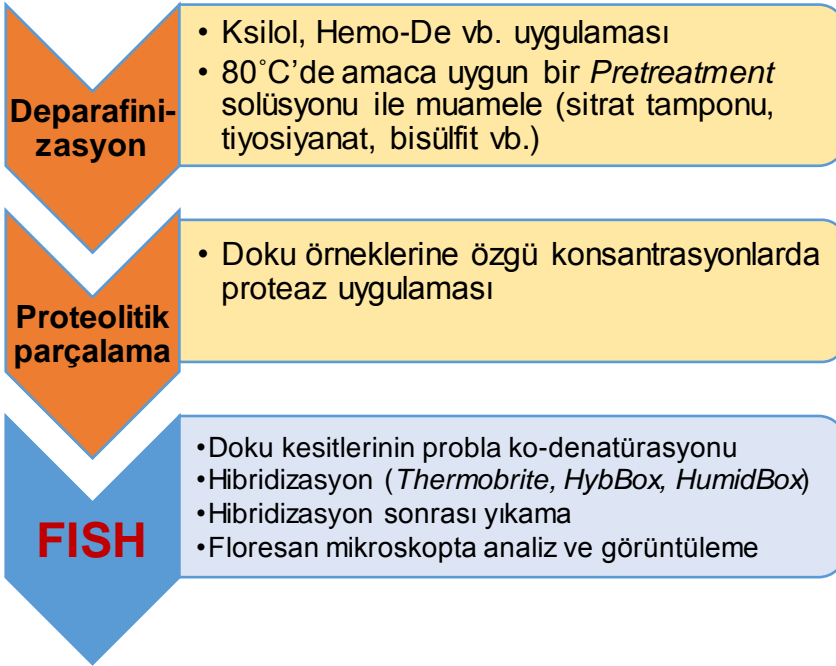
FISH Çalışmalarında Ön Uygulama (Pretreatment)

- Değişik protokoller içerebilen, hücrelerin FISH çalışması için mikroskop lamları üzerine fikse edilmesini, deparafinizasyonu ve enzim aşamasını içeren hazırlık sürecidir.

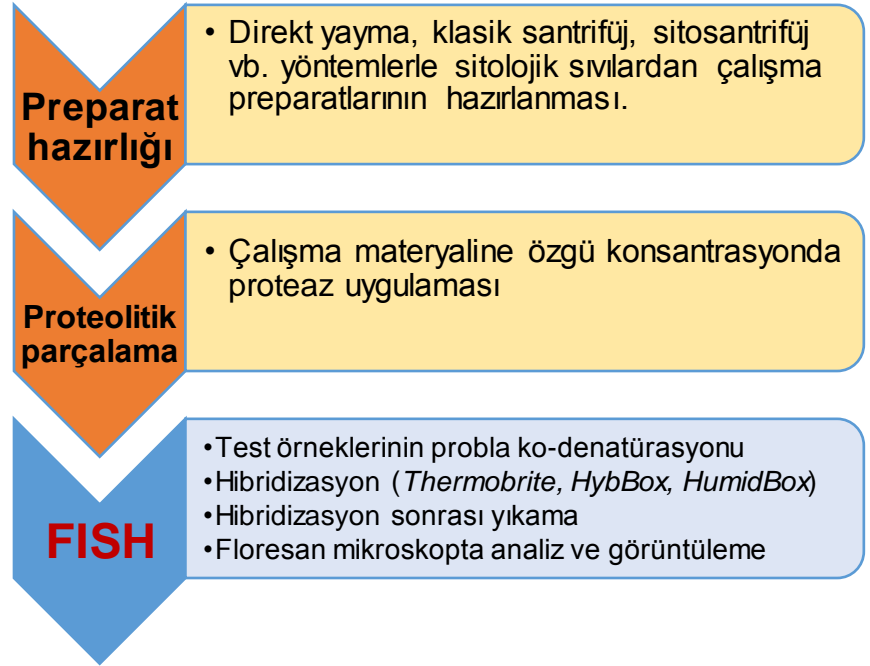


Doku ve Sitolojik örneklerde FISH uygulaması

Doku örneklerinde FISH



Sitolojik örneklerde FISH



Parafin Dokuda PRETREATMENT (ön muamele) aşamaları

- 1) Parafine gömülü doku kesitlerinden **Ksilol**, **SkipDewax™** vb. uygulamasıyla parafinin uzaklaştırılması.
- 2) Deparafinize edilmiş lamlarda, kimyasal reaktifler «*unmasking reagents*» kullanılarak nuklear DNA dizilerinin açığa çıkarılması (FISH *Pretreatment Reagent* (Abbott-Vysis), *Pre-Conditioner* (Insitus), Depamiks™ Ön Yıkama Solüsyonu (Medimiks) vs.).
- 3) Parafinden temizlenmiş ve maskelenmesi giderilmiş doku örneklerinin proteolitik yıkımı (örn: enzim reaktifi – pepsin).



- Dokuda FISH uygulaması, **parafine gömülü** doku kesitlerinin varlığı nedeniyle daha zahmetli, komplike prosedürleri içerir.
- Parafine gömülü doku kesitlerinde başarılı sonuçlar elde etmek için uygun bir *pretreatment* prosedürüne gerek duyulur;
 - 1) Parafinin hidrofobik özelliğinden dolayı probun hedef nukleuslara etkili şekilde ulaşamaması (*deparafinizasyon, dewaxing*)
 - 2) Nuklear DNA'nın hibridize olacak DNA probları için uygun duruma getirilmesi (*nuklear DNA'nın açılması, unmasking*)
 - 3) Probların nukleus içine girebilmesi için çapraz bağlı doku proteinlerinin parçalanma gereksinimi (*proteolitik yıkım, proteolytic digestion*)



Protokol aşamaları

Deparafinizasyon ve FISH Ön Hazırlık Uygulaması

56°C etüvde 1 gece inkübasyon

3 x 10 dk Ksilol

2 x 5 dk Absolü Etanol

80°C su banyosu, 40 dk Depamiks™ Ön Yıkama Solüsyonu

Oda sıcaklığında 10-15 sn dH₂O'da çalkalama

37°C etüvde, 40 dk Enzim çalışma solüsyonu ile inkübasyon

Oda sıcaklığında 10-15 sn dH₂O'da çalkalama

2 x 3 dk, 2XSSC uygulaması

3'er dk Etanol Serisi (%70, %85, %100)

DENATÜRASYON ve PROBLAMA işlemi.



DOKU KESİTİNDE FISH ÇALIŞMASI

- Parafin bloktan pozitif şarjlı lamlara 3-5 mikron kalınlığında kesitler alınır.
- Kesitler dökülmemesi için bir gece önceden 56-60⁰C'lik bir etüve konulmalıdır.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



PRETREATMENT

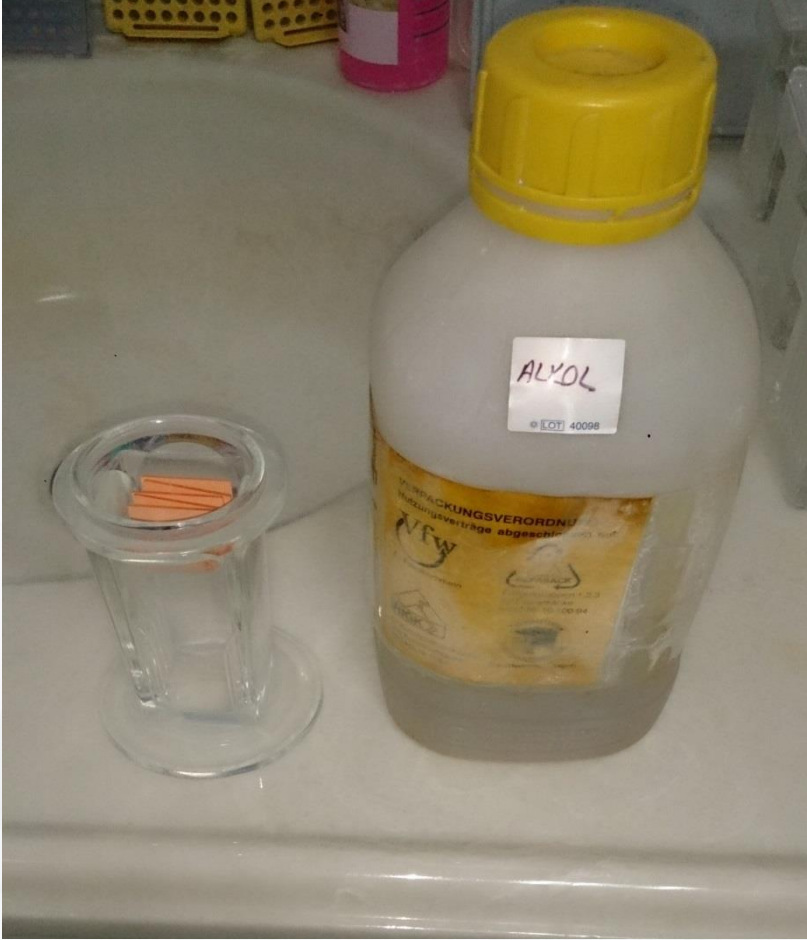
- Preparatlar 56-60⁰C'lik etüvden çıkartılarak 10' ar dk 3 ayrı ksilolden geçirilir.
- Ksilol yerine *SkipDewax*TM uygulaması da yapılabilir.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





- 2 kez 5'er dakika alkolden geçirilerek (absolü etanol) oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



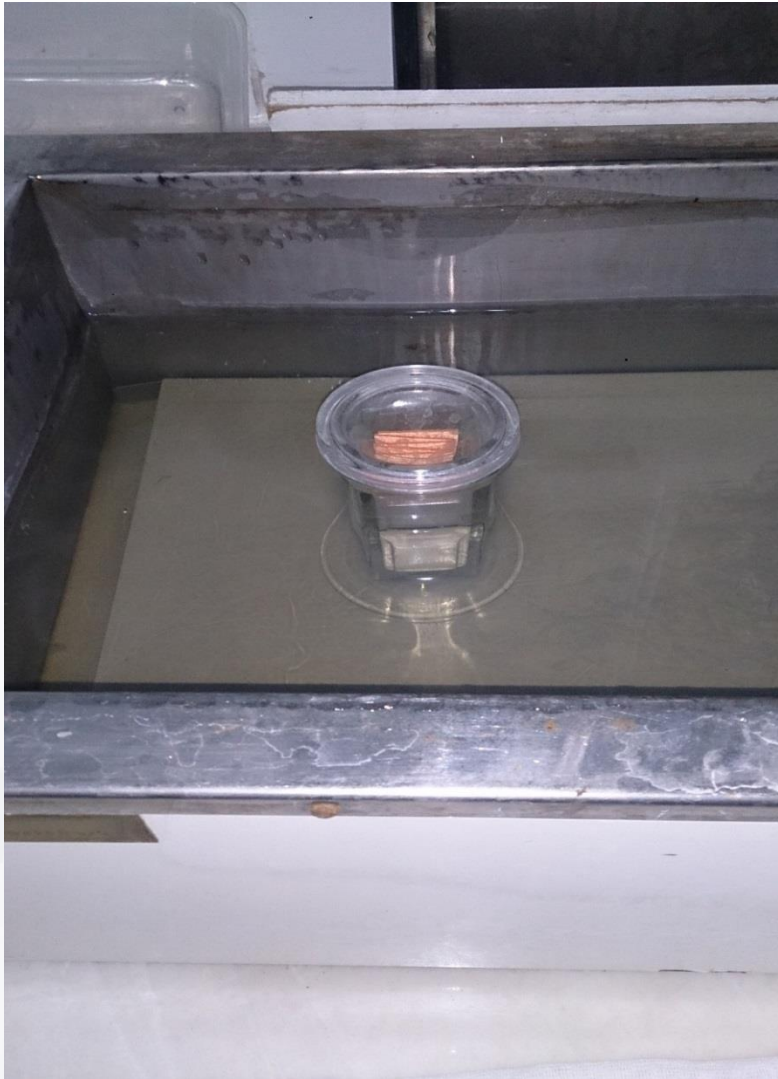


25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





- 80°C' e ulaşmış olan Depamiks™ ön yıkama solüsyonunda 30-45 dakika bekletilir.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



- Süre sonunda preparatlar 10-15sn distile su ile çalkalanır.



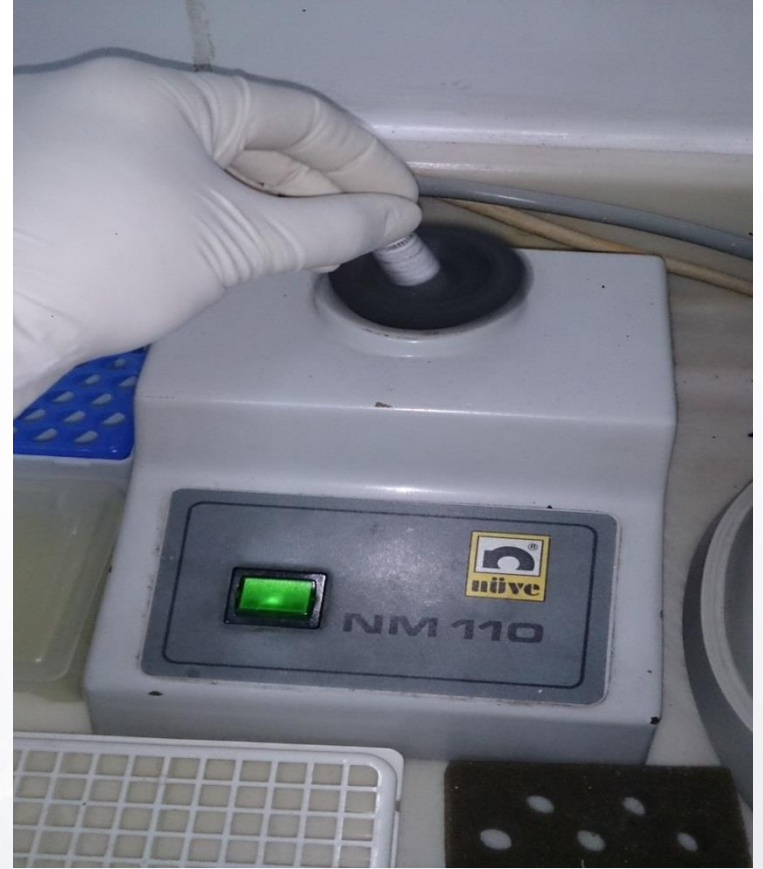
25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



Enzim Aşaması

- Ticari kitlerde yer alan ve çalışılacak doku tipine özgü konsantrasyonlarda hazırlanmış enzim reaktifleri -20°C 'den çıkarılarak, enzim çalışma solüsyonları hazırlanır.
- Derin dondurucuda saklanan enzim reaktifi 150 μl distile su ile sulandırılarak preparat kutusuna (15cc distile+150 μl 1M HCl) ilave edilir. Preparatlar bu solüsyona alınarak 37°C etüvde, 30-40 dakika bekletilir.





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





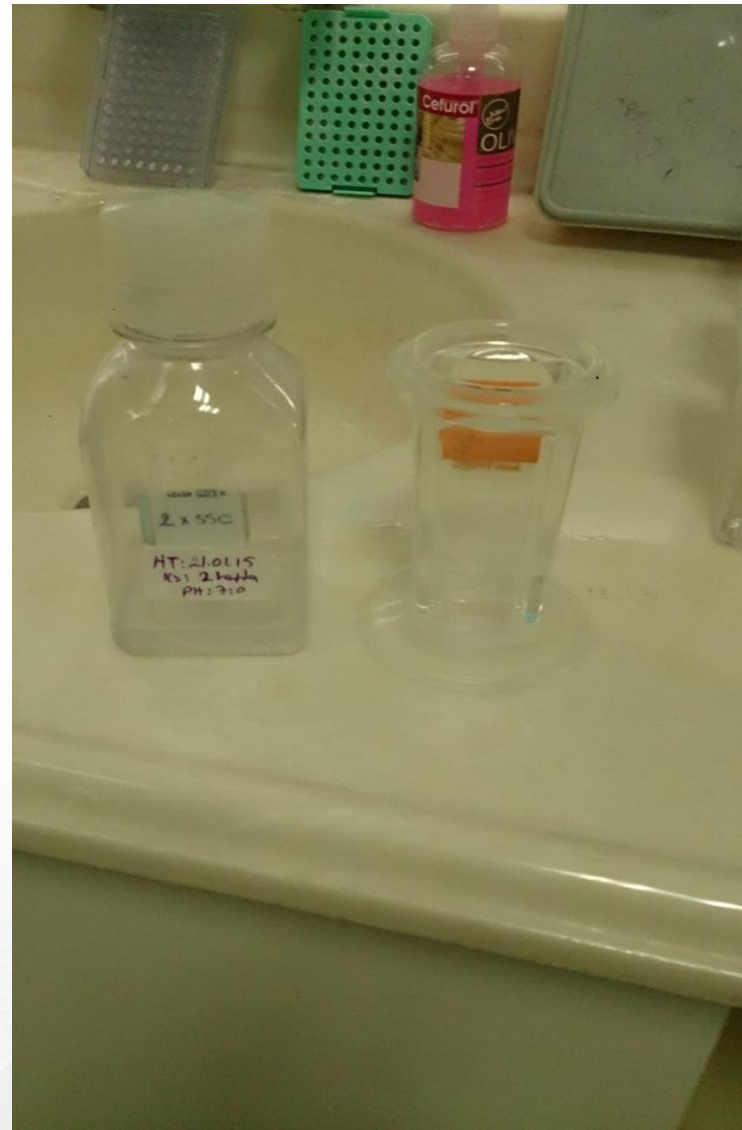
25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



- Etüvden çıkarılan preparatlar boş bir şaleye alınarak 7-8 defa distile su ile çalkalanır.
- Ardından 2 kez 3'er dakika 2XSSC uygulanır.



- 3'er dakika Alkol serisinden (%70, %85, %100 Etanol) geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

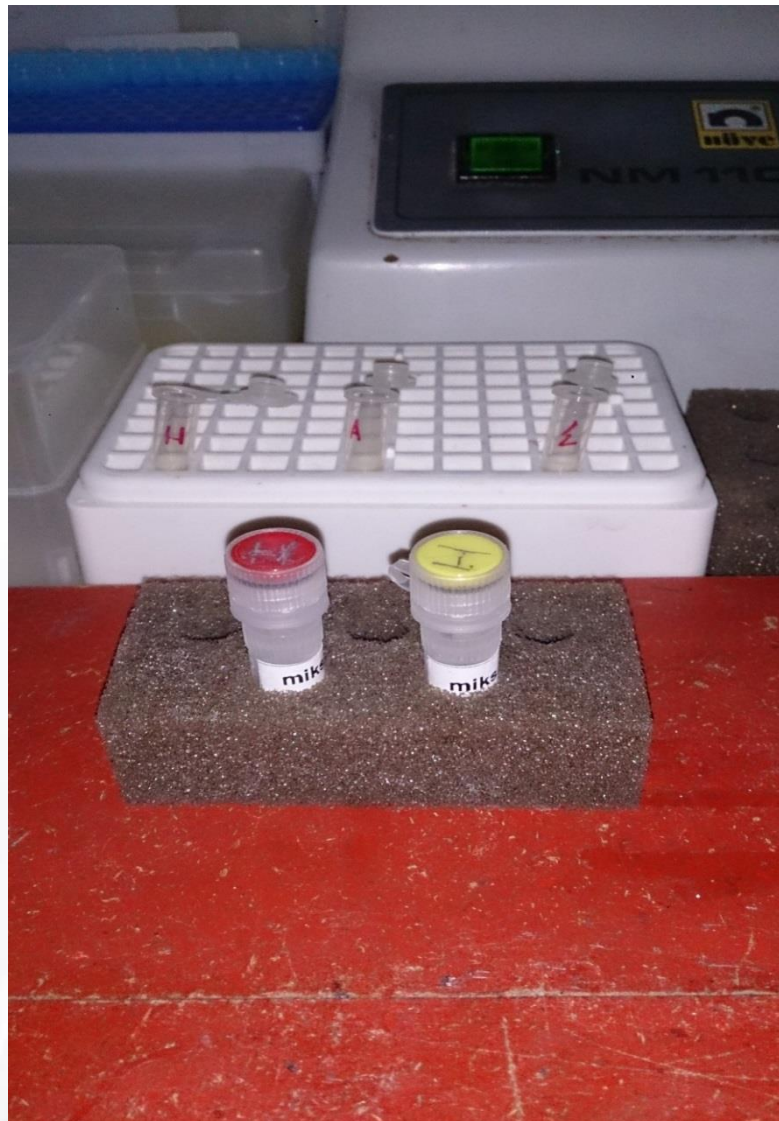
14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



Denatürasyon ve Hibridizasyon

- **Otomatik Denatürasyon / Hibridizasyon**
 - Cihaz 73-85⁰C'e ayarlanır (**kullanılan proba göre**)
 - Problar hazırlanır (prob+hibridizasyon tamponu)
 - Prob, lam üzerine damlatılıp lamelle kapatıldıktan sonra cihaza yerleştirilir
 - Örnek ve prob denatürasyonu ile hibridizasyon işlemi aynı anda, cihaz üzerinde gerçekleştirilir





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





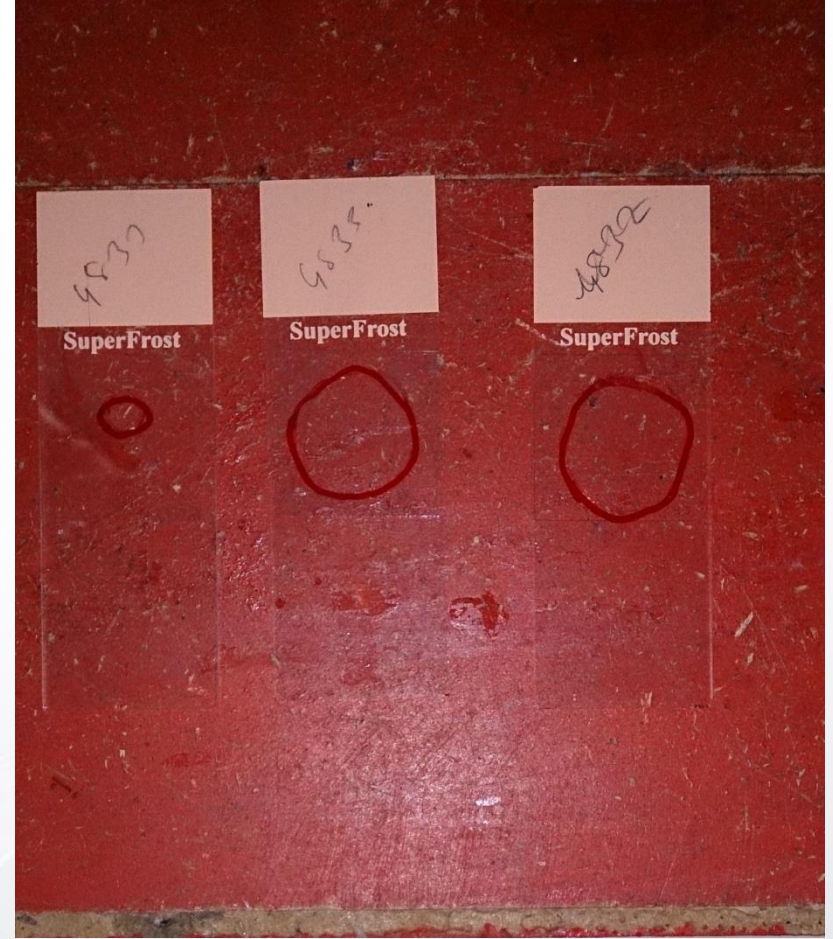
25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



- Preparatlar üzerine 5'er µl prob damlatılarak lamel kapatılır



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



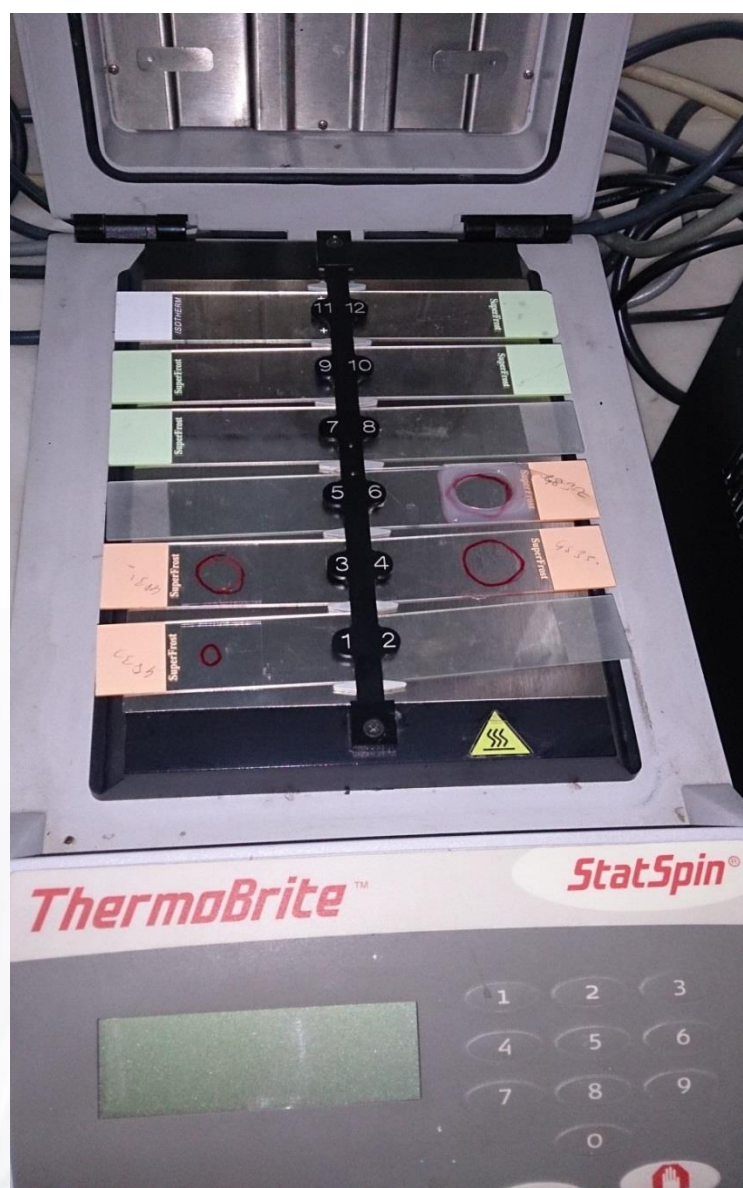
- Lamelin etrafı *rubber cement* ile yapıştırılarak otomatik denatürasyon / hibridizasyon cihazı üzerine yerleştirilir
- Program 73-85⁰C'de 5 dakika denatürasyon ve 16-18saat hibridizasyon olacak şekilde ayarlanır



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



• Manuel Denatürasyon / Hibridizasyon

- Denatürasyon solüsyonu (Formamid + 20XSSC + distile su) hazırlanıp, preparatlar 73-80 °C su banyosunda denatüre edilir.
- Preparatlar 3'er dakika alkol serisinden (%70, %85, %100) geçirilerek dehidrate edilir ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılır (* %70'lik alkol soğuk olmalıdır).
- Kullanılacak prob, çalışma protokolünde belirtilen denatürasyon sıcaklığına uygun olacak şekilde 73-80 °C su banyosunda denatüre edilir.
- Denatürasyon sonrası vorteks ve kısa süreli santrifüj yapılan prob karışımı, denatürasyonu yapılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuş lam üzerine damlatılıp, lamelle kapatılır. *Rubber cement* ile yapıştırılır.



- Ardından ışık geçirmeyen, nemli hibridizasyon kutularına alınarak 1-2 gece 37 °C etüvde bekletilir.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



Hibridizasyon Sonrası Yıkama

- **Yıkama Solüsyonu** hazırlanır
 - 10 ml 20XSSC+90 ml distile su karıştırılarak 2 şaleye bölünür.
 - 150 şer µl tween 20 eklenir.
- Şalelerden 1 tanesi su banyosuna konularak 73 °C'e ulaşması beklenir.
- Diğer şale oda ısısında bekletilir.



- Etüvden çıkarılan preparatların lamelleri çıkarılarak, oda sıcaklığındaki şalede yıkanır.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



- Preparatlar iç ısısı 73 °C'e ulaşan yıkama solüsyonuna alınarak 5 dakika bekletilir.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



- Su banyosundan çıkarılan preparatlar 10-15 sn distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılır



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



- Preparatlar üzerine 5-10'ar µl DAPI damlatılarak 24x50 mm lamel kapatılır.
- Sinyallerin daha parlak görülebilmesi için -20 °C'de en az 15-20 dakika bekletilir.



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



SİTOLOJİK PREPARATLARIN HAZIRLANMASI

- **Malign tanısı almış sitolojik yayma preparatları çalışılması gereken alan ucu elmas kalem ile preparatın arkasından çizilerek işaretlenir.**
- **Sıcak ksilolde bekletilerek lamelinin açılması ve balsamının uzaklaştırılması gerekir.**
- **Asit alkole alınarak dekolorize edilir. Bu şekilde FISH çalışmaya hazır hale gelir.**



PRETREATMENT

- Sitolojik yayma preparatları 10 dk 37⁰C'lik etüvdeki 2XSSC Solüsyonunda bekletilir.
- Preparatlar 37⁰C etüvde düz bir plate'e yerleştirilerek üzerine çalışma protokolünde belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanmış enzim uygulanarak 40 dk proteaz inkübasyonuna bırakılır.
- Bundan sonraki aşamalar parafin doku ile aynı şekilde devam eder.



Teşekkür ederim...



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA

