



- Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
- Spot 10µl of probe mixture onto the cell sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

#### Denaturation

- Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

#### Hybridisation

- Place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) overnight.

#### Post-Hybridisation Washes

- Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
- Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
- Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
- Drain the slide and apply 10µl - 15µl of DAPI antifade onto each sample.
- Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
- View with a fluorescence microscope.

#### Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark below 4°C.

#### Procedural Recommendations

- Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
- The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
- The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
- Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

#### Expected Results

In the normal cell, 2 red/green (can appear as yellow, Y) signals are expected (2Y). A translocation will result in 1R, 1G, 1Y: 1 green and 1 red signal from the derivative chromosomes and 1 fused red/green signals (can appear as yellow) from the normal chromosome.

#### Additional Information

For additional product information please contact the CytoCell Technical Support Department.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.cgt.com

### FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés cultivés ou non cultivés. La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique informative peut maintenant être utilisée comme un outil essentiel lors de l'analyse des chromosomes en prénatal, hématologie et pathologie. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après l'hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

#### Utilisation Prévue

Ce produit est destiné à être utilisé à des fins de recherche uniquement et n'est pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic.

#### Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région ROS1, 6q22.1, en Rouge

Sonde de la région ROS1, 6q22.1, en Vert

La sonde ROS1 Breakpart est constituée d'une sonde de 406 kb, marquée en vert, et de deux sondes de 299 kb et 171 kb, marquées en rouge, qui sont positionnées sur chaque côté du gène ROS1.

#### Conditionnement

Sonde: 50µl par tube ou 100µl par tube

La sonde est fournie prémélangée prête-à-emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

#### Contre-colorant: 150µl par tube

Le contre-colorant est le DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole)).

#### Avertissements et précautions

- Pour la recherche uniquement. Pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Toutes les matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations concernant l'élimination des déchets dangereux en vigueur dans votre établissement.

#### Conservation et manipulation

Le kit devra être stocké au congélateur entre -25°C et -15°C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette du kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

#### Recommandations sur les protocoles

Pour l'utilisation sur FFPE ou TMA.

#### Équipement nécessaire non fourni

- Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
- Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
- Bain-marie avec contrôle précis de la température à 72°C.
- Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
- Bocaux Coplin en plastique ou en verre.
- Pincettes.
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Lames de microscope.
- Lamelles 24x24mm.
- Chronomètre.
- Incubateur à 37°C.
- Colle à base de caoutchouc.
- Tissu Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Microscope à fluorescence recommandés

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100 watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes et du DAPI simultanément. Pour la visualisation des fluorochromes rouge et vert, utiliser le filtre double bande FITC/Texas Red.

#### Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon doit être effectuée conformément aux recommandations du guide des bonnes pratiques en cytogénétique.

Pour FISH, des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine d'une épaisseur de 4µm - 6µm doivent être utilisés.

#### Prétraitement des échantillons de tissu

Le prétraitement des échantillons de tissu doit être effectué conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Pour de meilleurs résultats, utiliser le Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Protocole FISH

(Remarque: Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire).

#### Protocole sur échantillons FFPE

##### Prétraitement des échantillons de tissu

Le prétraitement des échantillons de tissu doit être effectué conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Pour de meilleurs résultats, utiliser le Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

##### Pré-dénaturation

- Retirer la sonde du congélateur et la laisser se remettre à température ambiante (TA).
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever 10µl - 15µl (en fonction de la taille du tissu) de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remplacez rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
- Déposer 10µl - 15µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec de la colle à base de caoutchouc et laisser sécher.

##### Dénaturation

- Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.

##### Hybridation

- Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/- 1°C) dans un récipient humide et à l'abri de la lumière.

##### Lavages post-hybridation

- Retirer la lamelle et éliminer toute trace de colle à base de caoutchouc.
- Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agiter.
- Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à TA pendant 30 secondes sans agiter.
- Sécher la lame et appliquer 10µl - 15µl de DAPI antifade sur chaque échantillon.
- Recouvrir d'une lamelle, éliminer les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- Visualiser avec un microscope à fluorescence.

##### Commentaires:

L'efficacité de l'hybridation et la morphologie du tissu d'habitude ont une corrélation négative. Les méthodes de prétraitement agressives améliorant l'efficacité d'hybridation (p.ex. un long temps de digestion enzymatique) ont tendance à détruire la structure cellulaire et la morphologie du tissu. Néanmoins, les méthodes de prétraitement douces conservant les structures de tissu souvent ne sont pas suffisantes pour la pénétration de la sonde et l'obtention de bons résultats de FISH.

La durée optimale de prétraitement thermique et de digestion enzymatique dépendra de l'âge du bloc, de la composition du tissu et de la qualité de la fixation du tissu. La digestion enzymatique devrait être réduite pour les biopsies au trocart et pour toutes les coupes ne contenant que quelques cellules tumorales ou présentant de larges plages de nécrose. Ces échantillons doivent être utilisés avec une précaution particulière pour éviter une digestion excessive.

#### Protocole sur cellules de sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées

##### Préparation de la lame échantillon

- Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre. Laisser sécher.
- Plonger la lame dans du 2xSSC pendant 2 minutes à température ambiante sans agitation.
- Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante.
- Laisser sécher.

##### Pré-dénaturation

- Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever 10µl de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remplacez rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
- Déposer 10µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec du ruban adhésif et laisser sécher.

##### Dénaturation

- Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.

##### Hybridation

11. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/- 1°C) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide.

#### Lavages post-hybridation

12. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
13. Laver la lame dans du tampon 0.4xSSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
14. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes sans agitation.
15. Sécher la lame et appliquer 10µl de DAPI antifading sur chaque échantillon.
16. Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
17. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

#### Stabilité des lames

Les lames sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à au dessous de 4°C.

#### Recommandations

1. Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoCell Ltd.
2. L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandée pour mesurer les températures des solutions, bains-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
3. Les concentrations des lavages, pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une liaison non-spécifique de la sonde et une trop forte stringence peut résulter en une perte de signal.
4. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

#### Interprétation des résultats

Dans une cellule normale, 2 signaux rouge/vert (2J) (peuvent apparaître comme un signal jaune, J) doivent apparaître (2J). Une translocation génère 1R, 1V, 1J : 1 signal vert et 1 signal rouge provenant des chromosomes dérivés et 1 signal fusionné rouge/vert (peut apparaître comme un signal jaune) provenant du chromosome normal.

#### Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique CytoCell.  
T: +44 (0) 1223 294048  
E: techsupport@cytoCELL.com  
W: www.ogt.com

### ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, o in coltura dopo prelievo. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze. La FISH costituisce quindi un potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Recenti sviluppi hanno reso possibile che questa preziosa tecnica può ora essere applicata come strumento essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologia e patologica. Il DNA bersaglio, dopo la fissazione, è sottoposto a denaturazione al calore in presenza di formamide. Il DNA bersaglio è così disponibile per l'annealing con una sonda di DNA a singola elica a sequenza complementare, marcata con una sostanza fluorescente. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico, è rimossa per mezzo di lavaggi stringenti ed il DNA è in seguito colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza.

#### Destinazione d'uso

Questo prodotto è destinato ad essere utilizzato solo per scopi di ricerca e non per l'uso in procedure diagnostiche

#### Specifiche della sonda

Regione ROS1, 6q22.1, Rosso  
Regione ROS1, 6q22.1, Verde

La sonda Breakapart ROS1 consiste in una sonda verde da 406kb e due rosse da 299kb, 171kb che sono posizionate su ciascun lato del gene ROS1.

#### Materiali forniti

**Sonda:** 50µl per provetta o 100µl per provetta

Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato, SSC) e pronte per l'uso.

**Colorante di contrasto:** 150µl per provetta

Il colorante di contrasto è costituito da DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo)).

#### Avvertenze e precauzioni

1. Per uso ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche. Solo per uso professionale.
2. Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
3. Le miscele delle sonde contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camice da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti e camice da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
5. Lo smaltimento dei materiali pericolosi deve avvenire nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.

#### Conservazione e manipolazione

Conservare il kit in congelatore a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

#### Protocollo Raccomandazioni

Per l'uso su FFPE o TMA

#### Apparecchiature necessarie ma non fornite

1. Piastra riscaldante (dotata di superficie d'appoggio e controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
2. Micropipette a volume variabile con capacità da 1µl a 200µl e relativi puntali.
3. Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5ml).
5. Microscopio a fluorescenza (fare riferimento alla sezione Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza).
6. Vaschette di Coplin in plastica o in vetro.
7. Pinzette.
8. Olio di immersione per obiettivi per microscopia a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.
10. Vetrini per microscopia.
11. Vetrini copri oggetto da 24x24mm.
12. Timer.

13. Incubatore a 37°C.
14. Colla tipo mastice.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si consiglia di utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi planapocromatici 63x o 100x. Il filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare contemporaneamente tutti e tre i fluorofori e il DAPI. In alternativa, utilizzare il doppio filtro passabanda FITC/Texas Red per visualizzare i fluorofori rosso e verde.

#### Preparazione del campione

La preparazione del campione deve essere eseguita secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Per FISH devono essere utilizzati campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina con uno spessore da 4µm - 6µm.

#### Pretrattamento del campione di tessuto

Il pretrattamento del campione di tessuto deve essere eseguito secondo il protocollo in uso nel proprio laboratorio o istituzione. Per risultati ottimali utilizzare il Tissue Pretreatment Kit (LPS100).

#### Protocollo della FISH

(Nota: Imitare l'esposizione della sonda alle luci del laboratorio durante l'intera procedura).

#### Procedura FFPE

##### Pretrattamento del campione di tessuto

Il pretrattamento del campione di tessuto deve essere eseguito secondo il protocollo in uso nel proprio laboratorio o istituzione. Per risultati ottimali utilizzare il Tissue Pretreatment Kit (LPS100).

##### Pre-denaturazione

1. Rimuovere la sonda dal congelatore e attendere che raggiunga la temperatura ambiente (TA).
2. Mescolare con una pipetta la soluzione della sonda in modo da renderla omogenea.
3. Trasferire in una provetta da microcentrifuga 10µl - 15µl (a seconda delle dimensioni del tessuto) di sonda per ciascun test da eseguire. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
4. Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
5. Collocare 10µl - 15µl di miscela della sonda sul campione e cellulare e coprire delicatamente con un vetrino copri oggetto. Sigillare con una colla tipo mastice e attendere che la colla si asciughi completamente.

##### Denaturazione

6. Denaturare contemporaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 5 minuti.

##### Ibridazione

7. Disporre il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per tutta la notte.

##### Lavaggi post-ibridazione

8. Rimuovere accuratamente il vetrino copri oggetto e qualsiasi residuo di colla.
9. Lavare il vetrino in 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
10. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
11. Scolare il vetrino e applicare 10µl - 15µl di DAPI antifade su ciascun campione.
12. Coprire con un vetrino copri oggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
13. Esaminare con un microscopio a fluorescenza.

##### Commenti:

L'efficacia dell'ibridazione e la morfologia tissutale sono solitamente correlate in modo negativo. Procedure di pretrattamento aggressivo che aumentano l'efficacia dell'ibridazione (ad es., tempi prolungati di digestione enzimatica) tendono a distruggere la struttura cellulare e la morfologia tissutale. Tuttavia, un pretrattamento blando suscettibile di salvare le strutture tissutali potrebbe non essere sufficiente per garantire la penetrazione della sonda e per garantire risultati positivi di FISH.

La durata ottimale del pretrattamento al calore e della digestione enzimatica dipenderà dall'età del blocco, dalla composizione tissutale e dalla qualità del fissaggio tissutale. La digestione enzimatica deve essere ridotta al minimo per biopsie percutanee e per qualsiasi sezione suscettibile di contenere un numero ridotto di cellule tumorali o caratterizzata da vaste aree necrotizzate. I campioni devono essere manipolati con particolare attenzione al fine di evitare un'eccessiva digestione.

#### Sangue periferico o coltura di midollo osseo Procedura

##### Preparazione del vetrino

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare il vetrino.
2. Immergere i vetrini in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitazione.
3. Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti a TA.
4. Lasciare asciugare il vetrino.

##### Pre-denaturazione

5. Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA.
6. Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza.
7. Pipettare 10µl di sonda per test ed inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
8. Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
9. Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con il coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente.

##### Denaturazione

10. Denaturare simultaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 2 minuti.

##### Ibridazione

11. Disporre il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per tutta la notte.

##### Lavaggi post-ibridazione

12. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla.
13. Lavare il vetrino in 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
14. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
15. Scolare i vetrini e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
16. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
17. Analizzare con il microscopio a fluorescenza.

##### Stabilità dei vetrini ultimati

I vetrini sottoposti a FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio se conservata al buio sotto i 4°C

## Raccomandazioni per la procedura

1. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da CytoCell Ltd.
2. È fortemente consigliato l'uso di un termometro calibrato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per il funzionamento ottimale del prodotto.
3. Le concentrazioni, il pH e la temperatura dei lavaggi sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame aspecifico della sonda, mentre condizioni di stringenza troppo elevate possono determinare l'assenza di segnale.
4. Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.

## Interpretazione dei risultati

Nella cella normale sono attesi due segnali rosso/verde (2Y) (possono apparire come giallo Y). Una traslocazione avrà come risultato 1R, 1G, 1Y:1 segnale verde e 1 segnale rosso da cromosomi derivativi e 1 segnale fuso rosso/verde (può apparire come giallo) dal cromosoma normale.

## Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto con tattare il Reparto di Assistenza Tecnica CytoCell.  
T: +44 (0) 1223 294048  
E: techsupport@cytoCELL.com  
W: www.ogt.com

## DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen in fixierten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Dabei werden DNA-Sonden verwendet, die an ganze Chromosomen oder einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles Werkzeug für präinatale hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Nachdem die zu untersuchende DNA fixiert und denaturiert wurde, kann die Fluoreszenz markierte einzelsträngige Sonde daran binden. Nach der Hybridisierung werden nicht gebundene sowie unspezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschkübeln entfernt und die DNA zur Visualisierung gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

## Verwendungszweck

Dieses Produkt ist ausschließlich zu Forschungszwecken bestimmt und nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren.

## Sondenspezifikation

ROS1, 6q22.1, Region, Rot  
ROS1, 6q22.1, Region, Grün

Die ROS1-Brechersonde besteht aus einer grünen 406kb-Sonde und zwei roten 299kb-, 171kb-Sonden, die auf jeder Seite des ROS1-Gens positioniert sind.

## Bestandteile des Kits

**Sonde:** 50µl pro Röhrchen oder 100µl pro Röhrchen

Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

**Farbstoff für die Gegenfärbung:** 150µl pro Röhrchen

Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

## Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Forschungszwecke. Bestimmt nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Labpersonal.
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
3. Sondenmischungen enthalten Formamid, das Teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und Hautkontakt vermeiden. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
4. DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Ihren hausinternen Richtlinien zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

## Lagerung und Behandlung

Das Kit sollte bis zum Verfallsdatum, welches auf dem Etikett angegeben ist, in einem Gefrierschrank bei einer Temperatur zwischen -25°C und -15°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

## Protokoll Empfehlungen

Für den Einsatz auf FFPE oder TMA

## Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

1. Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperatursteuerung bis 80°C).
2. Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl.
3. Wasserbad mit genauer Temperatursteuerung bei 72°C.
4. Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml).
5. Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).
6. Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
7. Pinzette.
8. Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
9. Tischzentrifuge.
10. Objektträger für das Mikroskop.
11. 24x24mm Deckgläser.
12. Zeituhr.
13. 37°C-Inkubator.
14. Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

## Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Für die optimale Visualisierung der Probe empfehlen wir die Verwendung plan-apochromatischer Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung sowie einer 100-Watt Quecksilberlampe. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore und DAPI optimal geeignet. Alternativ dazu kann zur Beobachtung des roten und des grünen Fluorophors ein Zweifach-Bandpassfilter FITC/Texas Red verwendet werden.

## Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung sollte entsprechend der Richtlinien des Labors, bzw. des Institutes durchgeführt werden.  
Für FISH, sind 4µm - 6µm dicke formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeproben zu verwenden.

## Vorbehandlung von Gewebeproben

Gewebeproben werden gemäß den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbehandelt. Optimale Ergebnisse werden mit dem Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) erzielt.

## FISH-Protokoll

(Hinweis: Bitte versuchen Sie nach Möglichkeit, die Sonde vor Licht zu schützen.)

## FFPE-Verfahren

### Vorbehandlung von Gewebeproben

Gewebeproben werden gemäß den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbehandelt. Optimale Ergebnisse werden mit dem Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) erzielt.

## Prä-denaturierung

1. Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
2. Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren
3. Pro Test 10µl - 15µl (je nach Größe des Gewebes) Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
4. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
5. 10µl - 15µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

## Denaturierung

6. Denaturieren sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 5 minütiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

## Hybridisierung

7. Den Objektträger über Nacht 37°C (+/- 1°C) in eine feuchte, lichtdichte Kammer geben.

## Waschen nach der Hybridisierung

8. Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
9. Objektträger 2 Minuten lang bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) waschen.
10. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0), waschen.
11. Objektträger abtropfen lassen und 10µl - 15µl DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
12. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
13. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

## Bemerkungen:

Wirkungsgrad der Hybridisierung und Gewebemorphologie stehen gewöhnlich in negativem Zusammenhang. Aggressive Vorbehandlungsmethoden, die zu einem erhöhten Wirkungsgrad der Hybridisierung beitragen (z.B. eine verlängerte Enzymverdauungszeit), zerstören oft die Zellstrukturen und die Gewebemorphologie. Dennoch sind milde Vorbehandlungsmethoden, durch die die Gewebestrukturen erhalten bleiben, oft nicht ausreichend für das Eindringen der Sonde und erfolgreiche FISH Ergebnisse.

Die optimale Länge der Wärmeverbehandlung und Enzymverdauung hängt vom Alter des Blocks, der Gewebeszusammensetzung und der Qualität der Gewebefixierung ab. Die Enzymverdauung sollte für Kerngewebe sowie jegliche Schnitte, die nur wenige Tumorzellen oder große Nekrosebereiche enthalten, verkürzt werden. Solche Proben müssen besonders sorgfältig behandelt werden, um eine übermäßige Zersetzung zu vermeiden.

## Verfahren für periphere Blutproben oder kultivierte Knochenmarkzellen

### Vorbereitung des Objektträgers

1. Blutprobe auf Objektträger auftropfen und trocknen lassen.
2. Den Objektträger in 2xSSC für 2 Minuten bei RT eintauchen (schütteln nicht notwendig).
3. Dehydratation mittels Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Minuten bei RT.
4. Trocknen lassen.

## Prä-denaturierung

5. Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
6. Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren
7. Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
8. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
9. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

## Denaturierung

10. Denaturieren sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 2 minütiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

## Hybridisierung

11. Den Objektträger über Nacht bei 37°C (+/- 1°C) in eine feuchte, lichtdichte Kammer geben.

## Waschen nach der Hybridisierung

12. Deckgläserchen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
13. Objektträger 2 Minuten in 0,4 x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
14. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween-20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
15. Den Objektträger abtropfen lassen und 10µl des DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
16. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
17. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

## Stabilität der fertigen Objektträger

Objektträger mit FISH-Proben können bis zu einem Monat lang analysiert werden, wenn sie im Dunkeln bei oder unter 4°C aufbewahrt werden.

## Empfehlungen zur Durchführung

1. Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von CytoCell Ltd. empfohlen sind, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
2. Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
3. Die Konzentration der Waschlösungen, pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
4. Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.

## Zu erwartende Ergebnisse

In einer normalen Zelle sind zwei rot/grüne (oder fusionierte gelbe) Signale zu erwarten (2Y). In einer Zelle mit Translokation sollte ein deutliches rotes und ein grünes Signal zusätzlich zu einem rot/grünen (oder fusioniertem gelben) Signal des normalen Chromosoms 2 vorhanden sein (1R, 1G, 1Y).

## Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.  
T: +44 (0) 1223 294048  
E: techsupport@cytoCELL.com  
W: www.ogt.com

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibrida los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Recientes estudios indican que esta es una técnica que puede aplicarse como herramienta esencial de prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor para desnaturalizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturizada, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

**Uso Previsto**

Este producto está diseñado para ser utilizado en investigación y no en procedimientos de diagnóstico.

**Especificaciones de las sondas**

Región ROS1, 6q22.1, en Rojo  
Región ROS1, 6q22.1, en Verde

La sonda ROS1 Breakpart está formada por una sonda verde de 406 kb y dos sondas rojas de 299 kb y 171 kb, situadas a ambos lados del gen ROS1.

**Material incluido**

**Sonda:** 50µl por vial o 100µl por vial

Las sondas se presentan premezcladas en la solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC) y listas para usar.

**Contratinción:** 150µl por vial

La tinción se realiza con DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

**Advertencias y precauciones**

1. Para uso en investigación No en procedimientos de diagnóstico. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratinción DAPI.
3. La sonda contiene formamida, que es teratogena; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
4. La contratinción DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

**Almacenamiento y manipulación**

El kit debe almacenarse en un congelador a una temperatura comprendida entre -25°C y -15°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Los viales de las sondas y de la contratinción deben almacenarse en un lugar oscuro.

**Protocolo Recomendado**

Para uso en FFPE o TMA.

**Material necesario pero no incluido**

1. Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1µl a 200µl).
3. Baño maria con control preciso de temperatura a 72°C.
4. Tubos de microcentrifugación (0,5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
6. Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
7. Pinzas.
8. Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
9. Centrifuga sobremesa.
10. Portaobjetos para microscopio.
11. Cubreobjetos de 24x24mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37°C.
14. Pegamento de solución de caucho.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

**Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia**

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos Plan-Apochromat de 63 o 100 aumentos. El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos y DAPI. Para los fluorocromos rojo y verde debe emplearse el doble filtro pasabanda FITC/Texas Red.

**Preparación de la muestra**

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución.

En el caso de FISH, deben emplearse muestras de tejido embebido en parafina y fijado en formalina de entre 4µm - 6µm de grosor.

**Pretratamiento de las muestras de tejido**

El pretratamiento de las muestras de tejido debe realizarse de acuerdo con los protocolos del laboratorio o institución. Para un mejor resultado utilice el Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

**Protocolo para la FISH**

(Observación: asegúrese de limitar la exposición de la sonda a las luces del laboratorio en todo momento).

**Procedimiento para los FFPE**

**Pretratamiento de las muestras de tejido**

El pretratamiento de las muestras de tejido debe realizarse de acuerdo con los protocolos del laboratorio o institución. Para un mejor resultado utilice el Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

**Antes de la desnaturalización**

1. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a temperatura ambiente (TA).
2. Asegúrese de que la solución de la sonda queda homogéneamente mezclada con una pipeta.
3. Extraiga 10µl - 15µl (dependiendo del tamaño de la muestra) de la sonda por análisis e introduzca los en un tubo de microcentrifugación. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
4. Precaliente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
5. Vierta 10µl - 15µl de la solución de la sonda sobre la muestra de células y coloque cuidadosamente un cubreobjetos. Selle con pegamento de solución de caucho y deje que el pegamento se seque completamente.

**Desnaturalización**

6. Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta sobre la placa calefactora a 75°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.

**Hibridación**

7. Introduzca el porta en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) y déjelo toda la noche.

**Lavados post-hibridación**

8. Quite el cubreobjetos y los restos del pegamento cuidadosamente.
9. Sumerja el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.
10. Deje escurrir el portaobjetos y sumérjalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
11. Escurra el portaobjetos y añada 10µl - 15µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
12. Coloque un cubreobjetos, extraiga las burbujas y deje revelar el color en un lugar oscuro durante 10 minutos.
13. Visualice con un microscopio de fluorescencia.

**Comentarios:**

La eficiencia de la hibridación y la morfología tisular son inversamente proporcionales. Los procedimientos de pretratamiento agresivos que mejoran la eficiencia de la hibridación (por ejemplo, un tiempo de digestión enzimática más prolongado) tienden a destruir la estructura celular y la morfología tisular. Sin embargo, un pretratamiento suave que resguarde las estructuras tisulares puede no bastar para que la sonda penetre bien y los resultados de FISH sean adecuados.

La duración óptima del pretratamiento térmico y de la digestión enzimática dependerá de la edad del bloque, la composición del tejido y la calidad de la fijación tisular. La digestión enzimática debe reducirse en caso de biopsias de punción con aguja gruesa y en cualquier sección que contenga pocas células tumorales o tengan zonas vastas de necrosis. Estas muestras deben manipularse con especial atención para evitar una digestión excesiva.

**Procedimiento para la sangre periférica o la médula ósea cultivada**

**Preparación del portaobjetos**

1. Extender la muestra en un portaobjetos. Dejarlo secar.
2. Sumerja el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a temperatura ambiente sin agitación.
3. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada una a TA.
4. Dejarlo secar.

**Antes de la desnaturalización**

5. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA.
6. Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta.
7. Extraiga 10µl de la sonda por prueba, poner en un tubo de microcentrifuga. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
8. Precaliente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
9. Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente.

**Desnaturalización**

10. Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta en la placa caliente a 75°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.

**Hibridación**

11. Ponga el porta en un contenedor húmedo a prueba de luz a 37°C (+/- 1°C) toda la noche

**Lavados post-hibridación**

12. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente.
13. Lave el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.
14. Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitación.
15. Escurra el portaobjetos y añada 10µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
16. Aplique un cubreobjetos, elimine burbujas y deje reposar en oscuridad durante 10 minutos.
17. Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia.

**Estabilidad de los portaobjetos terminados**

Los portaobjetos sometidos a la técnica FISH pueden analizarse durante 1 mes si se conservan en un lugar oscuro debajo de 4°C.

**Recomendaciones para los procedimientos**





1. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por Cytocell Ltd.
2. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro de precisión para medir las temperaturas de soluciones, baños maria e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para un resultado óptimo del producto.
3. Las concentraciones de los lavados, el pH y las temperaturas son importantes ya que unas condiciones poco rigurosas pueden provocar una hibridación inespecífica de la sonda y unas condiciones demasiado rigurosas pueden derivar en una falta de señal.
4. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una hibridación inespecífica.

**Interpretación de los resultados**

En una célula normal aparecerán 2 señales rojo/verde (pueden aparecer como amarillas, A) (2A). Una translocación se reflejará en las señales 1R, 1V, 1A: 1 señal verde y 1 señal roja de los cromosomas derivados y 1 señal fusionada roja/verde (puede aparecer como amarilla) del cromosoma normal.

**Información adicional**

Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de CytoCell.  
 T: +44 (0) 1223 294048  
 E: techsupport@cytoCell.com  
 W: www.ogt.com

<b>REF</b>	<b>EN:</b> Catalogue number <b>DE:</b> Bestellnummer <b>FR:</b> Référence du catalogue <b>IT:</b> Riferimento di Catalogo <b>ES:</b> Número de catálogo
<b>LOT</b>	<b>EN:</b> Batch code <b>DE:</b> Loscode <b>FR:</b> Code du lot <b>IT:</b> Codice di lotto <b>ES:</b> Código
	<b>EN:</b> Consult instructions for use <b>DE:</b> Gebrauchsanweisung beachten <b>FR:</b> Consulter la notice d'utilisation <b>IT:</b> Consultare le istruzioni per l'uso <b>ES:</b> Consúltense las instrucciones de uso
	<b>EN:</b> Manufacturer <b>DE:</b> Hersteller <b>FR:</b> Fabricant <b>IT:</b> Fabbricante <b>ES:</b> Fabricante
	<b>EN:</b> Use by <b>DE:</b> Verwendbar bis <b>FR:</b> Utiliser jusqu'au <b>IT:</b> Utilizzare entro <b>ES:</b> Fecha de caducidad
	<b>EN:</b> Temperature limitation <b>DE:</b> Temperaturbegrenzung <b>FR:</b> Limites de température <b>IT:</b> Limiti di temperatura <b>ES:</b> Limitación de temperatura
<b>CONT</b>	<b>EN:</b> Contents <b>DE:</b> Inhalt <b>FR:</b> Contenu <b>IT:</b> Contenuto <b>ES:</b> Contenido

**Patents and Trademarks**

CytoCell is a registered trademark of CytoCell Ltd.  
 This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for research use only.

**Cytocell Ltd.**

Oxford Gene Technology,  
 418 Cambridge SciencePark,  
 Milton Road,  
 Cambridge, CB4 0PZ, UK  
 T: +44(0)1223 294048  
 F: +44(0)1223 294986  
 E: probes@cytoCell.com  
 W: www.ogt.com