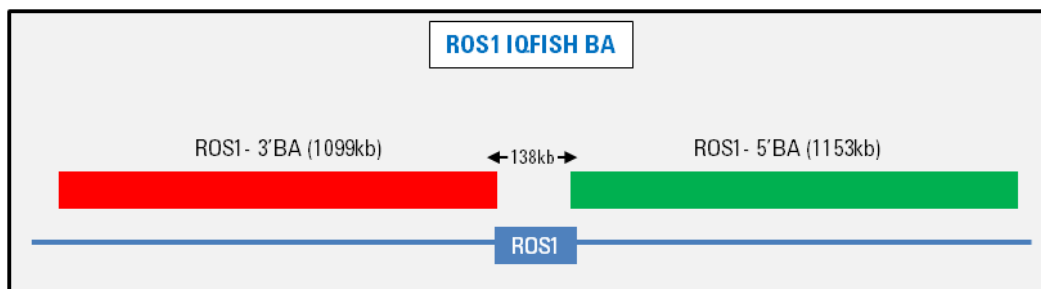


## ROS1 IQFISH Break-Apart Probe

Part number / Référence / Artikel-Nr.  
G111601-8



English

**Intended Use** The ROS1 IQFISH Break-Apart Probe is intended for the detection of rearrangements involving the ROS1 gene by fluorescence in situ hybridization (FISH). The probe is to be used on lung paraffin-embedded tissue sections.

**Summary** Break apart probes consist of two child probes, designed to be on opposite sides of the translocation break point for a given gene, each labeled in a different color. These probes generate signals in normal cells that are closely matched in size and co-localized (2 fusion). Following a translocation, the signals are “broken apart” and no longer co-localize (for example: 1 red, 1 green, 1 fusion).

### Kit Components

Component	Part Number	Volume	Storage
ROS1 IQFISH Break-Apart Probe	G111601-85510	200 µL	-25°C to -15°C

Keep the ROS1 IQFISH Break-Apart Probe protected from light whenever possible. A certificate of analysis is also shipped with the kit.

### Warnings and Precautions

- 1 For In Vitro Diagnostic Use.
- 2 Avoid microbial contamination, which may cause erroneous results.
- 3 All biological specimens and materials with which they come into contact should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions in accordance with federal, state and local regulations. Refer to the appropriate blood borne pathogen precautions indicated by your facility or local regulations. Never pipet by mouth. Avoid specimen contact with skin and mucous membranes.
- 4 Exercise standard precautions when obtaining, handling and disposing of potentially carcinogenic reagents.



Agilent Technologies

- 5 Exercise care to avoid cross-contamination of samples during all steps of this procedure, as this may lead to erroneous results.
- 6 Use powder-free gloves whenever possible to minimize introduction of powder particles into sample or kit materials.
- 7 Once opened, this product is stable for 30 days when stored at the recommended storage temperature.
- 8 Performance of the kit has been shown to be unaffected for up to 22 freeze-thaw cycles.
- 9 The clinical interpretation of any test results should be evaluated within the context of the patient's medical history and other diagnostic laboratory test results by qualified personnel.
- 10 Use of control slides is recommended.

**Use of Control Slides**

It is recommended to run control slides concurrently with patient slides to monitor assay performance and to assess the accuracy of signal enumeration.

**Safety Information**

A Material Safety Data Sheet(s) (MSDS) is available at [www.agilent.com](http://www.agilent.com).

**Indications of Instability or Deterioration**

Inspect packages upon arrival. If the tamper-evident label is opened at the perforations, or if the vial contents are thawed upon arrival, do not use the contents of the package. For customer service or technical support, please contact Agilent Genomics.

**Workflow Procedure**

Use the IQFISH probe with formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections. A protocol is provided in the table below. The protocol uses reagents from the Dako Histology Accessory Kit (Dako p/n K5799).

**Preparing the Slides for FISH**

- 1 Prepare the Dako Histology reagents.
  - Prepare 50 mL of 1× Dako Pre-Treatment Solution in a Coplin jar.
  - Prepare 500 mL of 1× Dako Wash Buffer.
- 2 De-paraffinize the samples.
  - Optional: Incubate the sample slides at 60°C for 1 hour.
  - Incubate the slides in a jar of xylene (or xylene substitutes) for 5 minutes at room temperature. Replace with fresh xylene and incubate 5 minutes more.
  - Incubate the slides in a jar of 100% ethanol for 2 minutes at room temperature. Replace with fresh 100% ethanol and incubate 2 minutes more.
  - Incubate the slides in a jar of 70% ethanol for 2 minutes at room temperature. Replace with fresh 70% ethanol and incubate 2 minutes more.
  - Incubate the slides in a jar of 1× Dako Wash Buffer for 2–5 minutes at room temperature.
- 3 Pre-treat the samples with Dako Pre-Treatment Solution using Option 1 or Option 2.
 

**Option 1: Pre-treat using a water bath**

  - Pre-heat the jar of 1× Dako Pre-Treatment Solution to 98°C in a water bath. Monitor the temperature inside the jar using a calibrated thermometer to ensure that the temperature reaches a minimum of 95°C without reaching the boiling point of 100°C.
  - Add the slides to the jar of 1× Dako Pre-Treatment Solution. Incubate for 10 minutes at 98°C.
  - Remove the jar from the water bath. Remove the lid and allow the contents to cool for 15 minutes at room temperature.
  - Incubate the slides in a jar of 1× Dako Wash Buffer for 3 minutes at room temperature. Replace with fresh 1× Dako Wash Buffer and incubate 3 minutes more.

**Option 2: Pre-treat using a microwave**

  - Add the slides to the jar of 1× Dako Pre-Treatment Solution and place the jar in a 1100-watt microwave oven. Heat at 100% power until the solution just begins to boil (~1–3 minutes).
  - Heat at 10–20% power for 10 minutes to keep the solution just below the boiling temperature. If using steam sensing microwave, heat for 10 minutes using sensing function.
  - Remove the jar from the microwave. Remove the lid and allow to cool for 15 minutes at room temperature.
  - Incubate the slides in a jar of 1× Dako Wash Buffer for 3 minutes at room temperature. Replace with fresh 1× Dako Wash Buffer and incubate 3 minutes more.

- 
- 4 Digest proteins using Pepsin.
    - Using a lint-free tissue, dry the area of the slide around the sample without disturbing the sample.
    - Add 5 drops of cold Dako Pepsin Solution to each slide, covering the sample in liquid.
    - Incubate the slides at 37°C for 7 minutes.
    - Incubate the slides in a jar of 1× Dako Wash Buffer for 3 minutes at room temperature. Replace with fresh 1× Dako Wash Buffer and incubate 3 minutes more.

- 5 Dehydrate the samples.
  - Incubate the slides in a jar of 70% ethanol for 2 minutes at room temperature.
  - Incubate the slides in a jar of 85% ethanol for 2 minutes at room temperature.
  - Incubate the slides in a jar of 100% ethanol for 2 minutes at room temperature.
  - Allow the slides to air dry completely at room temperature.

### Hybridizing to FISH Probe

- 1 Thaw the probe.
  - Thaw the IQFISH probe at room temperature.
  - Vortex the vial for 15 seconds then briefly spin in a microcentrifuge.
- 2 Denature the probe and chromosomal DNA.
  - Pipet 10 µL of the IQFISH probe onto a slide, covering the sample in liquid. Cover with a glass cover slip.
  - Seal the edges of the cover slip with Dako Coverslip Sealant.
  - Incubate the slides at 80°C for 10 minutes.
- 3 Hybridize the probe to the chromosomes.
  - Lower the incubation temperature to 45°C. Incubate the slides at 45°C for 1–2 hours.

### Washing and Viewing Slides

- 1 Wash the slides.
  - Prepare 100 mL of 1× Dako Stringent Wash Buffer. Divide the buffer between two Coplin jars.
  - Pre-heat one of the jars to 63°C in a water bath. Leave the other jar at room temperature.
  - Working with one slide at a time, peel off the Dako Coverslip Sealant then remove the cover slip. As you finish with each slide, put it into the room temperature jar of 1× Dako Stringent Wash Buffer.
  - Transfer the slides to the jar of 1× Dako Stringent Wash Buffer that is in the 63°C water bath. Incubate the slides at 63°C for exactly 10 minutes.
  - Incubate the slides in a jar of 1× Dako Wash Buffer (not the Stringent Wash Buffer) for 3 minutes at room temperature. Replace with fresh 1× Dako Wash Buffer and incubate 3 minutes more.
- 2 Dehydrate the samples.
  - Incubate the slides in a jar of 70% ethanol for 2 minutes at room temperature.
  - Incubate the slides in a jar of 85% ethanol for 2 minutes at room temperature.
  - Incubate the slides in a jar of 100% ethanol for 2 minutes at room temperature.
  - Allow the slides to air dry completely at room temperature, in the dark.
- 3 View the results.
  - Pipet 15 µL of mounting medium onto the slide and add a cover slip.
  - View the slide under a fluorescence microscope with Cy3/FITC or orange/green dual filter. Slides may be read after 15 minutes or within 7 days after mounting.

Store slides in the dark at –18°C to 8°C to minimize fading.

---

#### Limitations of the Procedure

Proper storage and handling of reagents and samples are essential for the performance. All laboratory equipment used to prepare the target during this procedure should be calibrated and maintained to ensure accuracy. Incorrect measurement of reagents may affect the outcome of the procedure.



**Utilisation prévue** La ROS1 IQFISH Break-Apart Probe est destinée à la détection des réarrangements impliquant le gène ROS1 par l'hybridation in situ en fluorescence (FISH). La sonde doit être utilisée sur des sections de tissus pulmonaires inclus en paraffine.

**Résumé** Les sondes de séparation consistent en deux sondes filles, conçues pour être situées sur les côtés opposés du point de rupture de translocation pour un gène donné, chacune marquée d'une couleur différente. Ces sondes génèrent des signaux dans des cellules normales qui sont de taille semblable et colocalisés (2 fusions). Après une translocation, les signaux sont « séparés » et ne sont plus colocalisés (par exemple : 1 rouge, 1 vert, 1 fusion).

#### Composants du kit

Composant	No de la pièce	Volume	Conservation
ROS1 IQFISH Break-Apart Probe	G111601-85510	200 µL	-25 °C à -15 °C

Dans la mesure du possible, conserver la ROS1 IQFISH Break-Apart Probe à l'abri de la lumière. Un certificat d'analyse est également expédié avec le kit.

#### Avertissements et Précautions

- 1 Pour une utilisation diagnostique in vitro.
- 2 Éviter toute contamination microbienne, cela pourrait entraîner des résultats erronés.
- 3 Tous les échantillons biologiques et les matériels en contact avec ceux-ci doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et jetés en prenant les précautions appropriées, conformément aux règlements locaux, régionaux et nationaux. Consulter les précautions adéquates à prendre contre les agents pathogènes transmissibles par le sang, indiquées par votre établissement ou la réglementation locale. Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact des échantillons avec la peau et les muqueuses.
- 4 Prendre les précautions types lors de l'obtention, la manipulation et l'élimination de réactifs potentiellement cancérogènes.
- 5 Prendre des précautions à toutes les étapes de cette procédure pour éviter une contamination croisée entre les échantillons, car cela pourrait produire des résultats erronés.
- 6 Si possible, utiliser des gants non poudrés pour minimiser l'introduction de particules de poudre dans l'échantillon ou les matériaux du kit.
- 7 Une fois ouvert, ce produit reste stable pendant 30 jours s'il est stocké à la température de conservation recommandée.
- 8 Il a été démontré que la performance du kit n'était pas altérée jusqu'à 22 cycles de gel-dégel.
- 9 L'interprétation clinique des résultats de tests doit être évaluée par du personnel qualifié en tenant compte des antécédents médicaux du patient et des autres résultats de tests diagnostiques de laboratoire.
- 10 L'utilisation de lames de contrôle est recommandée.

#### Utilisation de lames de contrôle

Il est recommandé d'analyser des lames de contrôle parallèlement aux lames du patient pour contrôler les performances du dosage et évaluer la précision du nombre de signaux.

#### Informations sur la sécurité

Une fiche technique de sécurité (MSDS) est disponible sur [www.agilent.com](http://www.agilent.com).

#### Indications d'instabilité ou de détérioration

Inspecter l'emballage à l'arrivée. Si l'étiquette de garantie d'invulnérabilité est ouverte au niveau des perforations, ou si le contenu du flacon était décongelé à son arrivée, ne pas utiliser le contenu de l'emballage. Pour joindre le service clientèle ou l'assistance technique, contacter Agilent Genomics.

#### Procédure relative au flux de travail

Utiliser la sonde IQFISH sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Un protocole est fourni dans le tableau ci-dessous. Ce protocole utilise des réactifs provenant du Dako Histology Accessory Kit (Dako n°K5799).

## Préparation des lames pour la FISH

### 1 Préparer les réactifs Dako Histology.

- Préparer 50 mL de 1× Dako Pre-Treatment Solution dans une jarre de Coplin.
- Préparer 500 mL de 1× Dako Wash Buffer.

### 2 Déparaffiner les échantillons.

- Facultatif : incuber les lames d'échantillons à 60 °C pendant 1 heure.
- Incuber les lames dans un récipient de xylène (ou de substituts de xylène) pendant 5 minutes à température ambiante. Renouveler le xylène et incuber 5 minutes supplémentaires.
- Incuber les lames dans un récipient rempli d'éthanol à 100 % pendant 2 minutes à température ambiante. Renouveler l'éthanol à 100 % et incuber 2 minutes supplémentaires.
- Incuber les lames dans un récipient rempli d'éthanol à 70 % pendant 2 minutes à température ambiante. Renouveler l'éthanol à 70 % et incuber 2 minutes supplémentaires.
- Incuber les lames dans un récipient contenant 1× Dako Wash Buffer entre 2 et 5 minutes à température ambiante.

### 3 Prétraiter les échantillons avec la Dako Pre-Treatment Solution en suivant soit l'option 1, soit l'option 2.

#### Option 1 : prétraiter au bain-marie

- Préchauffer le récipient contenant 1× Dako Pre-Treatment Solution à 98 °C au bain-marie. Contrôler la température à l'intérieur du récipient à l'aide d'un thermomètre étalonné afin de s'assurer que la température a atteint au moins 95 °C sans parvenir au point d'ébullition de 100 °C.
- Ajouter les lames dans le récipient contenant 1× Dako Pre-Treatment Solution. Incuber pendant 10 minutes à 98 °C.
- Retirer le récipient du bain-marie. Enlever le couvercle et laisser refroidir le contenu pendant 15 minutes à température ambiante.
- Incuber les lames dans un récipient contenant 1× Dako Wash Buffer pendant 3 minutes à température ambiante. Remplacer par 1× Dako Wash Buffer neuf et incuber pendant 3 minutes supplémentaires.

#### Option 2 : prétraiter au four à micro-ondes

- Ajouter les lames dans le récipient contenant 1× Dako Pre-Treatment Solution et le placer dans un four à micro-ondes à 1100 watts. Chauffer à 100 % de la puissance jusqu'à ce que la solution commence à bouillir (~ 1 à 3 minutes).
- Chauffer à une puissance de 10 à 20 % pendant 10 minutes pour maintenir la solution juste en dessous de la température d'ébullition. En cas d'utilisation d'un four à micro-ondes doté d'un détecteur de vapeur, chauffer pendant 10 minutes en utilisant la fonction de détection.
- Retirer le récipient du micro-ondes. Enlever le couvercle et laisser refroidir pendant 15 minutes à température ambiante.
- Incuber les lames dans un récipient contenant 1× Dako Wash Buffer pendant 3 minutes à température ambiante. Remplacer par 1× Dako Wash Buffer neuf et incuber pendant 3 minutes supplémentaires.

### 4 Digérer les protéines en utilisant la Pepsin.

- À l'aide d'un tissu non pelucheux, sécher la zone de la lame autour de l'échantillon sans toucher à l'échantillon.
- Ajouter 5 gouttes de Dako Pepsin Solution froide sur chaque lame, en recouvrant l'échantillon de liquide.
- Incuber les lames à 37 °C pendant 7 minutes.
- Incuber les lames dans un récipient contenant 1× Dako Wash Buffer pendant 3 minutes à température ambiante. Remplacer par 1× Dako Wash Buffer neuf et incuber pendant 3 minutes supplémentaires.

### 5 Déshydrater les échantillons.

- Incuber les lames dans un récipient rempli d'éthanol à 70 % pendant 2 minutes à température ambiante.
- Incuber les lames dans un récipient rempli d'éthanol à 85 % pendant 2 minutes à température ambiante.
- Incuber les lames dans un récipient rempli d'éthanol à 100 % pendant 2 minutes à température ambiante.
- Laisser sécher complètement les lames à l'air libre à température ambiante.

## Hybridation à la sonde FISH

### 1 Dégeler la sonde (ROS1 IQFISH Break-Apart Probe).

- Dégeler la sonde IQFISH à température ambiante.
- Mélanger le flacon à l'aide d'un vortex pendant 15 secondes, puis passer brièvement à la centrifugeuse.

- 2 Dénaturer la sonde et l'ADN chromosomique.
  - Pipeter 10 µL de la sonde IQFISH sur une lame, en recouvrant l'échantillon de liquide. Couvrir à l'aide d'une lamelle de protection en verre.
  - Sceller les bords de la lamelle de protection à l'aide du Dako Coverslip Sealant.
  - Incuber les lames à 80 °C pendant 10 minutes.
- 3 Hybrider la sonde sur les chromosomes.
  - Baisser la température d'incubation à 45 °C. Incuber les lames à 45 °C pendant 1 à 2 heures.

#### Lavage et affichage des lames

- 1 Laver les lames.
  - Préparer 100 mL de 1× Dako Stringent Wash Buffer. Répartir le tampon dans deux jarres de Coplin.
  - Préchauffer l'une des jarres à 63 °C au bain-marie. Laisser l'autre jarre à température ambiante.
  - Une lame à la fois, retirer le Dako Coverslip Sealant, puis enlever la lamelle de protection. Une fois le travail terminé avec une lame, la mettre dans la jarre à température ambiante contenant 1× Dako Stringent Wash Buffer.
  - Transférer les lames vers la jarre contenant 1× Dako Stringent Wash Buffer qui se trouve dans le bain-marie à 63 °C. Incuber les lames à 63 °C pendant exactement 10 minutes.
  - Incuber les lames dans une jarre contenant 1× Dako Wash Buffer (pas le Stringent Wash Buffer) pendant 3 minutes à température ambiante. Remplacer par 1× Dako Wash Buffer neuf et incuber pendant 3 minutes supplémentaires.
- 2 Déshydrater les échantillons.
  - Incuber les lames dans un récipient rempli d'éthanol à 70 % pendant 2 minutes à température ambiante.
  - Incuber les lames dans un récipient rempli d'éthanol à 85 % pendant 2 minutes à température ambiante.
  - Incuber les lames dans un récipient rempli d'éthanol à 100 % pendant 2 minutes à température ambiante.
  - Laisser sécher complètement les lames à l'air libre à température ambiante, dans l'obscurité.
- 3 Afficher les résultats.
  - Pipeter 15 µL de milieu de montage sur la lame et ajouter une lamelle de protection.
  - Afficher la lame sous un microscope à fluorescence en utilisant du Cy3/FITC ou un double filtre orange/vert. Les lames peuvent être analysées 15 minutes après le montage ou dans les 7 jours suivant le montage.

Pour minimiser la décoloration, conserver les lames à l'abri de la lumière entre –18 °C et 8 °C.

#### Limites de la procédure

De bonnes pratiques de conservation et de manipulation des réactifs et des échantillons sont essentielles pour garantir leur performance. Tous les équipements de laboratoire utilisés pour préparer la cible au cours de cette procédure doivent être calibrés et entretenus pour assurer leur précision. Une mesure incorrecte des réactifs peut altérer le résultat de la procédure.

Deutsch 

#### Verwendungszweck

Die ROS1 IQFISH Break-Apart Probe dient dem Nachweis von Umlagerungen des ROS1-Gens durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die Sonde ist für die Verwendung an paraffineingebetteten Lungen-Gewebeschnitten vorgesehen.

#### Zusammenfassung

Aufbrechsonden bestehen aus zwei untergeordneten Sonden, die auf gegenüberliegenden Seiten der Translokationsbruchstelle eines bestimmten Gens eingesetzt werden und jeweils mit einer unterschiedlichen Farbe gekennzeichnet sind. Diese Sonden generieren Signale in normalen Zellen, die von ähnlicher Größe und kolokalisiert sind (2x Fusion). Infolge einer Translokation werden die Signale „aufgebrochen“ und sind nicht mehr kolokalisiert (z. B. 1x rot, 1x grün, 1x Fusion).

#### Kit-Komponenten

Komponente	Artikel-Nr.	Volume (Volumen)	Lagerung
ROS1 IQFISH Break-Apart Probe	G111601-85510	200 µl	–25 °C bis –15 °C

Die ROS1 IQFISH Break-Apart Probe nach Möglichkeit immer vor Licht schützen. Ein Analysezertifikat wird mit dem Kit geliefert.

- Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen**
- 1 Zur In-vitro-Diagnostik.
  - 2 Mikrobielle Verunreinigung vermeiden, da diese zu inkorrekten Ergebnissen führen kann.
  - 3 Mit allen biologischen Proben und allen Materialien, die damit in Berührung kommen, ist so umzugehen, als könnten sie Krankheiten übertragen. Bei der Entsorgung sind angemessene Vorsichtsmaßnahmen sowie kommunale, einzel- bzw. bundesstaatliche Richtlinien zu beachten. Es sind die jeweiligen Vorsichtsmaßnahmen für durch Blut übertragene Krankheitserreger zu beachten, die durch Ihre Einrichtung oder staatliche Richtlinien vorgegeben sind. Niemals mit dem Mund pipettieren. Haut- und Schleimhautkontakt mit Proben vermeiden.
  - 4 Bei der Empfangnahme, der Handhabung und der Entsorgung von potenziell krebserregenden Reagenzien sind die Standard-Vorsichtsmaßnahmen anzuwenden.
  - 5 Bei allen Schritten dieses Vorgangs vorsichtig vorgehen, um eine Kreuzkontamination der Proben zu vermeiden, da dies zu inkorrekten Ergebnissen führen kann.
  - 6 Nach Möglichkeit immer puderfreie Handschuhe verwenden, damit keine Pulverpartikel in die Proben- oder Kit-Materialien gelangen.
  - 7 Nach dem ersten Öffnen ist dieses Produkt etwa 30 Tage haltbar, wenn es bei der empfohlenen Lagertemperatur aufbewahrt wird.
  - 8 Die Leistung des Kits wird nachweislich über bis zu 22 Einfrier-/Auftau-Vorgänge nicht beeinträchtigt.
  - 9 Die klinische Auswertung aller Testergebnisse sollte von qualifiziertem Personal unter Berücksichtigung der Krankengeschichte des Patienten und anderer Diagnostik-Labortests vorgenommen werden.
  - 10 Die Verwendung von Kontrollobjektträgern wird empfohlen.

**Verwendung von Kontrollobjektträgern** Es wird empfohlen, Kontrollobjektträger und Patientenobjektträger gleichzeitig zu untersuchen, um die Leistung der Probe zu beobachten und die Genauigkeit der Auszählung der Signale zu bewerten.

**Sicherheitsinformationen** Ein Material-Sicherheitsdatenblatt (Material Safety Data Sheet, MSDS) ist unter [www.agilent.com](http://www.agilent.com) abrufbar.

**Hinweise auf Instabilität oder Produktzerfall** Verpackung beim Eingang überprüfen. Wenn das Verschluss-Sicherungsetikett an den Perforierungen geöffnet ist, oder wenn die Fläschchen-Inhalte vor Ankunft getaut sind, den Packungsinhalt nicht verwenden. Für Kundendienst und technischen Support ist Agilent Genomics zu kontaktieren.

**Arbeitsablauf** Die IQFISH-Sonde mit formalinfixierten und paraffineingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten verwenden. Ein Protokoll ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Im Protokoll wurden Reagenzien des Dako Histology Accessory Kit (Dako p/n K5799) verwendet.

#### Vorbereiten der Objektträger für die FISH

- 1 Die Dako Histology-Reagenzien vorbereiten.
  - 50 ml von 1× Dako Pre-Treatment Solution in einer Coplin-Küvette vorbereiten.
  - 500 ml von 1× Dako Wash Buffer vorbereiten.
- 2 Die Proben entparaffinieren.
  - Optional: Die Probenobjektträger 1 Stunde bei 60 °C inkubieren.
  - Die Objektträger in einem Gefäß mit Xylol (oder Xylolersatz) 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Gefäß mit frischem Xylol füllen und weitere 5 Minuten inkubieren.
  - Die Objektträger in einem Gefäß mit 100 %igem Ethanol 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Gefäß mit frischem 100 %igem Ethanol füllen und weitere 2 Minuten inkubieren.
  - Die Objektträger in einem Gefäß mit 70 %igem Ethanol 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Gefäß mit frischem 70 %igem Ethanol füllen und weitere 2 Minuten inkubieren.
  - Die Objektträger in einem Gefäß mit 1× Dako Wash Buffer 2 – 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

---

**3** Die Proben mit Dako Pre-Treatment Solution unter Verwendung von Option 1 oder Option 2 vorbehandeln.

**Option 1: Mithilfe eines Wasserbades vorbehandeln**

- Das Gefäß mit 1× Dako Pre-Treatment Solution in einem Wasserbad auf 98 °C vorheizen. Die Temperatur im Gefäß mithilfe eines kalibrierten Thermometers überprüfen, um sicherzustellen, dass sie mindestens 95 °C, aber nicht den Siedepunkt bei 100 °C erreicht.
- Die Objektträger in das Gefäß mit 1× Dako Pre-Treatment Solution hinzugeben. 10 Minuten bei 98 °C inkubieren.
- Das Gefäß aus dem Wasserbad entnehmen. Den Deckel entfernen und den Inhalt 15 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Die Objektträger in einem Gefäß mit 1× Dako Wash Buffer 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Gefäß mit frischem 1× Dako Wash Buffer füllen und weitere 3 Minuten inkubieren.

**Option 2: Mithilfe eines Mikrowellenherdes vorbehandeln**

- Die Objektträger in das Gefäß mit 1× Dako Pre-Treatment Solution hinzugeben und das Gefäß in einen Mikrowellenherd mit 1.100 Watt stellen. Bei voller Leistung aufheizen, bis die Lösung gerade zu kochen beginnt (~1 – 3 Minuten).
- Bei 10 – 20 % Leistung 10 Minuten aufheizen, um die Temperatur der Lösung gerade unter dem Siedepunkt zu halten. Bei Verwendung eines Mikrowellenherdes mit Dampferkennung 10 Minuten mithilfe der Erkennungsfunktion aufheizen.
- Das Gefäß aus dem Mikrowellenherd entnehmen. Den Deckel entfernen und den Inhalt 15 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Die Objektträger in einem Gefäß mit 1× Dako Wash Buffer 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Gefäß mit frischem 1× Dako Wash Buffer füllen und weitere 3 Minuten inkubieren.

---

**4** Die Proteine mithilfe von Pepsin andauen.

- Den Bereich des Objektträgers um die Probe mit einem fusselfreien Tuch abtrocknen, ohne die Probe zu berühren.
- 5 Tropfen kalter Dako Pepsin Solution auf jeden Objektträger geben, sodass die Probe mit Flüssigkeit bedeckt ist.
- Die Objektträger 7 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- Die Objektträger in einem Gefäß mit 1× Dako Wash Buffer 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Gefäß mit frischem 1× Dako Wash Buffer füllen und weitere 3 Minuten inkubieren.

---

**5** Die Proben dehydrieren.

- Die Objektträger in einem Gefäß mit 70 %igem Ethanol 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Objektträger in einem Gefäß mit 85 %igem Ethanol 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Objektträger in einem Gefäß mit 100 %igem Ethanol 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Objektträger bei Raumtemperatur an der Luft vollständig trocknen lassen.

---

### Hybridisieren an eine FISH-Sonde

**1** Die Sonde (ROS1 IQFISH Break-Apart Probe) auftauen.

- Die IQFISH-Sonde bei Raumtemperatur auftauen.
- Das Fläschchen mit einem Vortexer 15 Sekunden mischen, dann kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.

---

**2** Die Sonde und die chromosomale DNA denaturieren.

- 10 µl der IQFISH-Sonde auf einen Objektträger pipettieren, sodass die Probe mit Flüssigkeit bedeckt ist. Mit einem Deckglas abdecken.
- Die Ränder des Deckglases mit Dako Coverslip Sealant versiegeln.
- Die Objektträger 10 Minuten bei 80 °C inkubieren.

---

**3** Die Sonde an die Chromosomen hybridisieren.

- Die Inkubationstemperatur auf 45 °C senken. Die Objektträger 1 – 2 Stunden bei 45 °C inkubieren.

---

### Waschen und Überprüfen der Objektträger

**1** Die Objektträger waschen.

- 100 ml von 1× Dako Stringent Wash Buffer vorbereiten. Den Puffer auf zwei Coplin-Küvetten aufteilen.
  - Eines der Gefäße in einem Wasserbad auf 63 °C vorheizen. Das andere Gefäß bei Raumtemperatur belassen.
  - Einen Objektträger nach dem anderen bearbeiten. Dako Coverslip Sealant abstreifen, dann das Deckglas entfernen. Zum Abschluss jeden Objektträger in das Gefäß mit 1× Dako Stringent Wash Buffer bei Raumtemperatur geben.
  - Die Objektträger in das Gefäß mit 1× Dako Stringent Wash Buffer geben, das sich in dem Wasserbad mit 63 °C befindet. Die Objektträger genau 10 Minuten bei 63 °C inkubieren.
  - Die Objektträger in einem Gefäß mit 1× Dako Wash Buffer (nicht Stringent Wash Buffer) 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Gefäß mit frischem 1× Dako Wash Buffer füllen und weitere 3 Minuten inkubieren.
-



---

**2** Die Proben dehydrieren.

- Die Objektträger in einem Gefäß mit 70 %igem Ethanol 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Objektträger in einem Gefäß mit 85 %igem Ethanol 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Objektträger in einem Gefäß mit 100 %igem Ethanol 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Die Objektträger im Dunkeln bei Raumtemperatur an der Luft vollständig trocknen lassen.

---

**3** Die Ergebnisse überprüfen.

- 15 µl Fixiermittel auf den Objektträger pipettieren und ein Deckglas auflegen.
- Den Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop mit Cy3/FITC oder orangem/grünem Doppelfilter überprüfen.  
Die Objektträger können in einem Zeitraum zwischen 15 Minuten und 7 Tagen nach Fixierung abgelesen werden.

---

Um ein Verblässen so gering wie möglich zu halten, sind die Objektträger bei –18 °C bis 8 °C im Dunkeln aufzubewahren.

---

**Beschränkungen  
des Verfahrens**

Die ordnungsgemäße Aufbewahrung und Handhabung der Reagenzien und Proben ist entscheidend für die Leistung. Alle Laborgeräte, die bei diesem Verfahren zur Vorbereitung der Zielsequenz eingesetzt werden, sollten kalibriert und gewartet werden, um eine optimale Genauigkeit zu gewährleisten. Eine inkorrekte Messung der Reagenzien kann das Ergebnis des Verfahrens beeinflussen.



**Technical Support  
Assistante  
technique  
Technischer  
Kundendienst**

Country Pays Land	E-mail Adresse électronique E-mail	Telephone (Local toll-free) Téléphone (Local gratuit) Telefon (Gebührenfreie Nummer)
Austria / Österreich / Autriche	customercare_Austria@agilent.com	01 25125 6800
Belgium / Belgien / Belgique	customercare_Belgium@agilent.com	02 404 92 22
Denmark / Dänemark / Danmark	customercare_Denmark@agilent.com	45 70 13 00 30
Finland / Finnland / Finlande	customercare_Finland@agilent.com	010 802 220
France / Frankreich / France	customercare_France@agilent.com	0810 446 446
Germany / Deutschland / Allemagne	customercare_Germany@agilent.com	0800 603 1000
Italy / Italien / Italie	customercare_Italy@agilent.com	800 012575
Netherlands / Niederlande / Pays-Bas	customercare_Netherlands@agilent.com	020 547 2600
Spain / Spanien / l'Espagne	customercare_Spain@agilent.com	901 11 68 90
Sweden / Schweden / Suède	customercare_Sweden@agilent.com	08 506 4 8960
Switzerland / Schweiz / Suisse	customercare_Switzerland@agilent.com	0848 8035 60
UK/Ireland Großbritannien / Irland Royaume-Uni / Irlande	customercare_UK@agilent.com	0845 712 5292

**All other countries / Tous les autres pays / Alle anderen Länder**

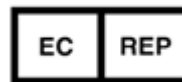
Find local contact information at <http://www.agilent.com/genomics/contactus>  
 Finden Sie lokale Kontaktinformationen bei <http://www.agilent.com/genomics/contactus>  
 Trouvez des informations de contact local à <http://www.agilent.com/genomics/contactus>

**Symbol Table  
Tableau des  
symboles  
Symboltabelle**

	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer		European Conformity Conformité européenne Europäische Konformität
	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung		Use-by date Date de péremption Haltbarkeitsdatum
	Temperature limit Limite de température Temperaturbegrenzung		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Enthält Material für <n> Tests		In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum
	Irritant Irritant Reizend		Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten
	Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft		Unique Device Identifier Identifiant unique des dispositifs (IUD) Eindeutige Geräteerkennung



Agilent Technologies, Inc.  
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA  
Manufactured at:  
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA  
[www.agilent.com](http://www.agilent.com)



Agilent Technologies Denmark ApS  
Produktionsvej 42  
2600 Glostrup, Denmark

© Agilent Technologies, Inc. 2014, 2016, 2022



Revision B2, June 2022



5990-7264