



Instructions For Use

REF: LPU 014



DiGeorge/TBX1 Probe (22q11) with 22q13.3 Deletion Syndrome Probe Combination

FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei of fixed cultured or uncultured cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Target DNA, after fixation and denaturation is available for annealing to a similarly denatured, fluorescently labelled DNA probe which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed by a series of rapid formamide-free stringent washes and the DNA counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

Probe Specification

TBX1 (22q11.2) Region Probe Red
22qter Subtelomere Specific Probe (N85A3) Probe Green

Introduction

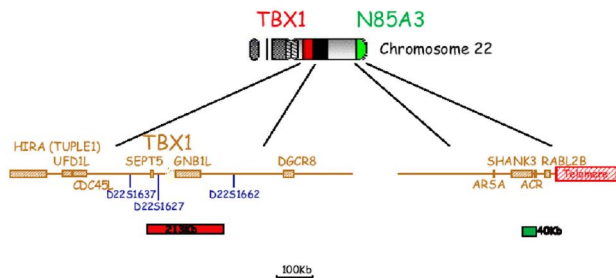
DiGeorge syndrome (DGS)¹ and a variety of congenital malformation syndromes, including Velocardiofacial (VCF)² and Conotruncal Anomaly Face syndromes³ share the phenotypic features covered by the acronym CATCH22 (cardiac defects; abnormal facies; thymic hypoplasia; cleft palate; hypocalcaemia) and deletion of chromosome 22 at 22q11.2^{4,5,6}. In addition around 17% of nonsyndromic patients with isolated conotruncal defects have been shown to have a 22q11.2 microdeletion⁷. The incidence of these anomalies is estimated to be 1:4000 live births⁸ and therefore the deletion 22q11.2 represents one of the most common genetic defects.

A region of 2 Mb referred to as the DiGeorge Critical Region (DGCR) is most commonly deleted in up to 90% of patients^{9,10}. Within the DGCR a minimal critical region of 480-575 kb has been described^{11,12} containing several genes including the T-box transcription factor -TBX1, a key candidate for the aortic arch malformations and anomalies related to pharyngeal apparatus and ear development seen in DGS^{13,14,15}. In addition, TBX1 may play a role in behaviour¹⁶. About 35% patients with DiGeorge develop psychiatric disorders, mainly schizophrenia and bipolar disorder.

22q13.3 deletion syndrome

The 22q13.3 deletion syndrome presents a recognisable phenotype characterised by hypotonia, delay or absence of expressive speech, moderate to profound mental retardation, normal to accelerated growth and mild dysmorphic features¹⁷. Some deletions of the terminal region of chromosome 22q are cytogenetically visible. However, a few cases of cryptic deletions have been reported^{17,18} suggesting that the actual incidence of 22q telomere deletion may be higher than previously thought.

Several observations of patients with 22q13.3 deletion showed that the ProSAP2/SHANK3²⁴ gene, coding for a structural protein of the postsynaptic density of excitation synapses and expressed in the cortex and cerebellum of the brain¹⁹, was disrupted^{19,20,21} or deleted²², making it a good candidate gene for this syndrome. The deletion varies widely in size, from 130kb to 9Mb^{22,23,24}. Recent findings therefore recommend the use of 22q subtelomeric probes distal to the ARSA gene for examining all 22q13.3 deletions^{24,25}.



The TBX1 Region Probe labelled in red, is approximately 213 kb, contains the D22S1627 marker. The 22qter subtelomere specific probe (clone N85A3), labelled in green, is sited in the ProSAP2/SHANK3 gene, allows identification of the most distal 22q13.3 deletions. Both probes allow identification of chromosome 22, acting as control probes. In the normal cell, there should be two red and two green signals (2R, 2G) whilst a deletion of the DGCR probe target results in one red signal and two green controls (1R, 2G) and a deletion of the 22q subtelomeric probe results in two red controls and one green signal (2R, 1G).

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100 µl per vial (10 tests)

Amount of TBX1 probe : 7.3 ng/test

Amount of 22q probe: 108.2 ng/test

The probe is provided premixed and ready to use in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC). The probe DNA is directly labelled: TBX1 Probe with a red fluorophore (specificity to the Texas Red spectrum) and the 22q Control Probe with a green fluorophore (specificity to the FITC spectrum).

Counterstain: 150 µl per vial (15 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. Probe mixtures contain formamide which is a teratogen ; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

Storage and Handling

The Aquarius kit should be stored at 620°C until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

- a) Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C)
- b) Variable volume micropipettes range 1 µl to 200 µl
- c) Water bath with accurate temperature control at 72°C
- d) Microcentrifuge tubes (0.5 ml)
- e) Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section)
- f) Plastic or glass coplin jars
- g) Forceps
- h) Fluorescence grade microscope lens immersion oil
- i) Bench top centrifuge

Fluorescence Microscope Recommendation

For optimal visualisation of the probe we recommend a 100 watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100. The Triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red is optimal for viewing all three fluorophores simultaneously.

Sample Preparation

The kit is designed for use on cultured peripheral blood cells fixed in Carnoy's fixative and should be prepared according to the laboratory or institution guidelines

Prepare blood metaphase spreads on microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

FISH Protocol

Slide preparation

1. Spot cell sample onto cleaned microscope slide.
2. Immerse slide in 2 x SSC, pH 7.0 for 2 mins.
3. Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 mins.

Pre-Denaturation

4. Remove probe from -20°C freezer and allow to warm to RT.
5. Ensure probe solution is uniform by repeated pipette mixing.
6. Remove 10 µl of probe and place on cell sample slide, cover with a 24 x 24mm glass coverslip and seal with rubber solution glue.

Denaturation

7. Place slide on to a 75°C (+/-1°C) hotplate and denature for 2 minutes.

Hybridisation:

8. **Hybridise slide overnight** in a humid, lightproof container at 37°C (+/-1°C).

Post-Hybridisation Washes

9. Remove coverslip and all traces of glue carefully.
10. Wash slide in 0.4 x SSC at 72°C (+/-1°C) (pH 7.0) for 2 mins.
11. Drain slide and wash in 2 x SSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds.
12. Drain the slide and apply 10 µl of DAPI antifade.
13. Cover with a coverslip and allow colour to develop in the dark for 10 mins.
14. View with fluorescence microscope.

Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark at or below room temperature.

Procedural Recommendations

1. Baking or aging of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
2. 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.
3. The wash concentrations (stringency), pH and temperature 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.

Customer Support

Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department.

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 de cellules cytogénétiques fixées, cultivées ou non cultivées. 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. 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 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 la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Caractéristiques de la sonde

TBX1 6 Fluorochrome rouge
22q 6 Fluorochrome vert

Le syndrome de DiGeorge¹ et une variété de syndromes malformationnels congénitaux, incluant le syndrome vélocardio-facial (VCF)² et les Conotruncal Anomaly Face syndromes³ (syndrome de Cayler, syndrome de Takao) partagent des caractéristiques phénotypiques communes couvertes par l'acronyme CATCH22 (C : cardiac anomaly = malformations cardiaques; A : abnormal facies = dysmorphie faciale; T : thymic hypoplasia = sous-développement du thymus; C : cleft palate = fente palatine; H : hypocalcaemia = hypocalcémie) et la délétion du chromosome 22 au niveau de la région 22q11.2^{4,5,6}. De plus, il a été montré qu'environ 17% des patients ne présentant pas de syndrome mais présentant des cardiopathies conotruncales isolées ont une microdélétion 22q11.2⁷. L'incidence de ces anomalies est estimée à 1:4000 nouveaux-nés⁸ et par conséquent la délétion 22q11.2 représente une des anomalies génétiques les plus communes.

Une région de 2 Mb décrite comme la région critique du syndrome de DiGeorge (DGCR) est délétée chez plus de 90% des patients^{9,10}. Dans cette DGCR, une région minimale critique de 480-575 kb a également été décrite^{11,12}, elle contient entre autres le gène TBX1 (T-box transcription factor), un candidat clé pour expliquer les malformations cardiaques, ainsi que les anomalies liées à l'appareil pharyngal et au développement oculaire, retrouvées dans le syndrome de DiGeorge^{13,14,15}. Le gène TBX1 pourrait également jouer un rôle dans le comportement¹⁶. Approximativement 35% des patients avec un DiGeorge développent des troubles psychiatriques, principalement de type schizophrénique et troubles bipolaires.

Remarque : syndrome délétionnel 22q13.3

Il syndrome délétionnel 22q13.3 présente un phénotype reconnaissable caractérisé par une hypotonie, un retard ou absence de langage, un retard mental modéré à sévère, une croissance normale ou accélérée et une dysmorphie.¹⁷ Certaines délétions de la région terminale du bras long du chromosome 22 sont visibles en cytogénétique classique. Cependant quelques cas de délétions cryptiques ont été reportés,^{17,18} suggérant que l'incidence de la délétion télomérique 22qter puisse être plus élevée que précédemment reportée.

Plusieurs observations de patients avec une délétion 22q13.3 ont montré que le gène ProSAP2/SHANK3, codant pour une protéine structurale de densité postsynaptique des synapses excitatrices et exprimée dans le cortex et le cervelet,¹⁹ était cassé^{20,21,22} ou délété²³, faisant de ce gène un bon gène candidat pour ce syndrome. Les délétions varient fortement en taille, de 130 kb à 9 Mb.^{22,23,24} De récentes études recommandent l'utilisation de sondes subtélomériques 22q distales au gène ARSA afin d'analyser toutes les délétions 22q13.3 distales.^{24,25}

La sonde de la région TBX1, marquée en rouge, fait approximativement 213 kb et contient le marqueur D22S1627. La sonde subtélomérique spécifique 22qter (n85a3), marquée en vert, sert de sonde contrôle. Cette dernière sonde peut également servir à détecter des microdélétions de la région 22q13.3 (locus SHANK3). Dans une cellule normale, on observe 2 spots rouges et 2 spots verts contrôles (2R, 2G). Dans une cellule présentant une délétion au niveau de TBX1, on observe 1 spot rouge et 2 spots verts contrôles (1R, 2G).

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests) ou 100 µl par tube (10 tests)

Concentration de sonde TBX1: 7.3 ng/test

Concentration de sonde de contrôle 22q: 108.2 ng/test

La sonde est fournie prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC). La sonde ADN est directement marquée : TBX1 avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red) et 22q avec un fluorochrome vert spectre FITC.

Contre-colorant : 150 µl par tube (15 tests)

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

Avertissements et précautions

1. Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
2. Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
3. 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.
4. 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.
5. Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et manipulation

Le kit Aquarius doit être conservé à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Matériel nécessaire non fourni

Équipement

- a) Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C)
- b) Micropipettes 1µl - 200µl
- c) Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C
- d) Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- e) Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres)
- f) Jattes en plastique ou en verre
- g) Forceps
- h) Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- i) Centrifugeuse de paillasse

Microscope et filtres

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

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour l'utilisation sur des cellules du sang périphérique cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparés selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou l'institution.

Préparer les étalements métaphasiques sur des lames à microscope selon les techniques standards de cytogénétique.

Protocole FISH

Préparation de la lame échantillon

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre.
 2. Plonger la lame dans du 2 x SSC, pH 7.0 pendant 2 minutes.
 3. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain.
- Pré-Dénaturation
5. Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.
 6. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
 7. Prélever 10 µl de sonde et la déposer sur la lame échantillon, et couvrir avec une lamelle en verre 24 x 24mm.

Sceller avec du rubber cément et laisser sécher.

Dénaturation

8. Placer la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) et dénaturer pendant 2 minutes.
- Hybridation
9. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/1°C) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide ou chambre d'hybridation.

Lavages post-hybridation

10. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément
11. Laver la lame dans du tampon 0,4 x SSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
12. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à température ambiante pendant 30 secondes.
13. Egoutter la lame et déposer 10 µl de DAPI antifading.
14. Couvrir avec une lamelle et laisser la coloration se développer dans l'obscurité pendant 10 minutes.
15. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Stabilité des lames

Les lames FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et/ou au-dessous de la température ambiante.

Recommandations

1. Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
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 (stringence), 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.

Support Client

Veuillez contacter Cytocell, Département Ventes/Marketing ou votre agent local.

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, 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. 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.

Specifiche della sonda

TBX1 rosso

22q verde

La sindrome di DiGeorge¹ ed altre sindromi legate a malformazioni congenite, compreso le sindromi facciali conosciute come Anomalia velocardiofaciale (VCF)² e Anomalia conotruncale³, hanno in comune le caratteristiche fenotipiche espresse dall'acronimo CATCH22 (cardiac defects; abnormal facies; thymic hypoplasia; cleft palate; hypocalcaemia ó difetti cardiaci, facies anomala, ipoplasia timica, palatoschisi, ipocalcaemia) e delezioni a carico del cromosoma 22 nella regione 22q11.2^{4,5,6}. Inoltre, è stato dimostrato che il 17% di pazienti non sindromici con difetti conotruncali isolati è caratterizzato da microdelezioni 22q11.2⁷. Si stima un'incidenza di queste anomalie pari a 1:4000 parti di feti vivi⁸ e, di conseguenza la delezione 22q11.2 rappresenta uno dei difetti genetici più comuni. Nel 90% dei pazienti, la regione più frequentemente deleta, lunga 2Mb, è conosciuta sotto il nome di DiGeorge Critical Region (DSCR)^{9,10}. All'interno della DSCR è stata descritta una piccola regione di 480-575 Kb^{11,12} che contiene diversi geni, tra cui il fattore di trascrizione T-box 1 -TBX1, un candidato chiave per le malformazioni dell'arco aortico, le anomalie correlate dell'apparato faringeo e quelle dello sviluppo dell'orecchio osservate nella DGS^{13,14,15}. Inoltre, il TBX1 può giocare un ruolo nei disturbi del comportamento¹⁶. Il 35% circa dei pazienti con la DiGeorge sviluppa disturbi psichiatrici (prevalentemente schizofrenia e disturbi bipolari).

Nota: Sindrome da delezione 22q13.3

La sindrome legata alla delezione 22q13.3 ha un fenotipo riconoscibile, caratterizzato da ipotonia, ritardo o assenza di linguaggio espressivo, ritardo mentale da lieve a grave, crescita normale o accelerata e lievi caratteristiche dismorfiche¹⁷.

Alcune delezioni a carico della regione terminale del cromosoma 22q sono visibili citogeneticamente. Tuttavia, sono stati riportati pochi casi di delezioni criptiche^{17,18} suggerendo l'ipotesi che l'incidenza reale della delezione a carico del telomero 22q possa essere superiore a quanto ipotizzato in precedenza.

Diverse osservazioni di pazienti con la delezione 22q13.3 hanno indicato che il gene ProSAP2/SHANK3 risultava distrutto^{19,20,21} o deletato²² rendendolo un buon candidato per questa sindrome. Esso codifica per una proteina strutturale della zona densa postsinaptica di sinapsi di eccitazione ed espresso nella corteccia cerebrale e nel cervelloletto. La dimensione della delezione varia molto, da 130kb a 9Mb^{22,23,24}, di conseguenza, recenti scoperte raccomandano l'uso di sonde subtelermeriche 22q distali al gene ARSA per l'esame di tutte le delezioni 22q13.3^{24,25}.

La sonda subtelermerica specifica 22qter (clone n85a3) è localizzata nel gene ProSAP2/SHANK3 e permette l'identificazione delle delezioni 22q13.3 più distali. La sonda DiGeorge permette l'identificazione del cromosoma 22 ed ha la funzione di sonda di controllo.

La sonda della regione TBX1, marcata in rosso, è lunga circa 213 kb e contiene il marcatore D22S1627. La sonda specifica subtelermerica 22qter associata, marcata in verde, ha la funzione di sonda di controllo. La cellula normale è identificata da due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2G) mentre la cellula con delezioni presenta un unico segnale rosso e due segnali di controllo verdi (1R, 2G).

Materiale fornito

Sonda : 50µl per provetta (5 test) o 100µl per provetta (10 test)

Quantità di sonda di TBX1: 7.3 ng/test

Quantità di sonda 22q: 108.2 ng/test

La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Dextrano solfato; SSC). Il DNA della sonda è marcato direttamente: Sonda TBX1 marcata con un fluorocromo rosso (spettro Texas Red) e 22q marcata con un fluorocromo verde (spettro FITC).

Colorante di contrasto : 150 µl per provetta (15 test)

Il colorante di contrasto è il DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole))

Avvertenze e misure precauzionali

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale.
2. Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
3. Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza cancerogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti, camicia da laboratorio e maneggiare in una cappa aspirante. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è altamente cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare i guanti ed un camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
5. Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei rifiuti tossici.

Conservazione e utilizzo

Conservare il kit Aquarius a 620°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

Materiali necessari non forniti

Apparecchiature

- a) Piastra riscaldante (con controllo accurato della temperatura fino a 80°C)
- b) Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl e 200µl
- c) Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C
- d) Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- e) Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri)
- f) Contenitori di Coplin in plastica o vetro
- g) Pinzette
- h) Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- i) Centrifuga da banco

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt ed obiettivi plan apochromat 63x e 100x. Il filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare tutti e tre i fluorocromi contemporaneamente.

Preparazione del campione

Il kit è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy e preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Preparare sospensioni dense di cellule ematiche in metafase sui vetrini campione seguendo le procedure standard di citogenetica.

Protocollo

Preparazione del vetrino

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia pulito
2. Immergere il vetrino in SSC 2x, pH 7,0 per 2 minuti
3. Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti

Pre-denaturazione

4. Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA
5. Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente
6. Rimuovere 10µl di sonda e caricarli sul vetrino con il campione cellulare, coprire con un coprioggetti da 24 x 24 mm e sigillare con soluzione collante gommosa

Denaturazione

7. Porre il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) e denaturare per 2 minuti.

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

9. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla
10. Lavare il vetrino in SSC 0,4x (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti
11. Scolare il vetrino e lavare in SSC 2x, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi
12. Scolare il vetrino e applicare 10µl di DAPI antifade
13. Coprire con un vetrino coprioggetto e far sviluppare il colore al buio per 10 minuti
14. Analizzare con il microscopio a fluorescenza

Stabilità dei vetrini finiti

I vetrini FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio a temperatura ambiente o inferiore.

Raccomandazioni per l'uso

1. Evitare l'essiccamento del vetrino ad alte temperature o una qualunque altra forma di invecchiamento dello stesso in quanto ciò potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
2. Si raccomanda fortemente l'utilizzo di un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, dei bagni termostati ed i vetrini in quanto critiche per il funzionamento ottimale del prodotto.
3. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono importanti in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo alte possono portare alla perdita del segnale.

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell.

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen bei fixierten Kulturen oder nicht in Kultur gezüchteten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Die Technik verwendet DNA-Sonden, die an gesamte Chromosomen oder an einzelne, einmalige Sequenzen hybridieren und dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Die Ziel-DNA wird zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA nach dem Fixieren mit Hitze und Formamid behandelt, wodurch sie einzelsträngig wird. So kann sich die Ziel-DNA an eine ebenso denaturierte, einzelsträngige fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz anlagern. Nach der Hybridisierung werden nichtgebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschworgängen unter stringenten Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondenspezifikation

TBX1 Rot

22q Grün

Das DiGeorge-Syndrom¹ und eine Reihe von angeborenen Fehlbildungssyndromen, wie unter anderem das velo-kardio-faziale (VCF)² und das konotrunkale Gesichtsanomaliesyndrom³ haben die phänotypischen Eigenschaften gemeinsam, die unter dem Akronym CATCH22 (Herzfehler, abnorme Gesichtszüge, Thyrmushypoplasie, Gaumenspalte, Hypokalazämie) zusammengefasst werden, sowie auch eine Deletion bei Locus 22q11.2 auf Chromosom 22^{4,5,6}. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass etwa 17% der Patienten, die kein Syndrom aufweisen, aber unter einem isolierten konotrunkalen Defekte leiden, eine 22q11.2 Mikrodeletion⁷ zeigten. Die Inzidenzrate dieser Anomalien wird auf 1:5000 Lebendgeburtens geschätzt⁸, was bedeutet, dass die Deletion von 22q11.2 einen der am weitesten verbreiteten genetischen Defekte darstellt.

Eine Region von 2 Mb, die als DiGeorge Critical Region (DSCR) bezeichnet wird, ist am häufigsten deletiert, in bis zu 90% der Patienten^{9,10}. Innerhalb der DSCR wurde eine entscheidende Minimalregion von 480675 kb beschrieben^{11,12}, die mehrere Gene enthält, einschließlich des T-Box-Transkriptionsfaktors TBX1. TBX1 ist ein Hauptkandidat für die Fehlbildungen des Aortenbogens und Anomalien in Verbindung mit der Entwicklung des Pharynx und des Ohrs, die bei DGS beobachtet werden^{13,14,15}. Darüber hinaus ist TBX1 möglicherweise an der Verhaltenssteuerung beteiligt¹⁶. Etwa 35% der Patienten mit DiGeorge-Syndrom entwickeln psychiatrische Störungen, hauptsächlich Schizophrenie und manisch-depressive Erkrankung.

Anmerkung: 22q13.3 Deletions syndrom

Das 22q13.3 Deletionsyndrom zeigt einen erkennbaren Phänotyp, der durch Hypotonie, Verzögerung oder Fehlen der sprachlichen Ausdrucksfähigkeit, mäßige bis tiefgreifende mentale Retardierung, normales bis beschleunigtes Wachstum

und milde Dysmorphien gekennzeichnet ist.¹⁷ Einige Deletionen des Terminalbereichs von Chromosom 22q sind zytogenetisch sichtbar. Es wurden jedoch einige wenige Fälle von kryptischen Deletionen berichtet^{17,18}, was nahe legt, dass die tatsächliche Inzidenzrate der 22q Telomerdeletion höher sein könnte, als bisher angenommen.

Mehrere Beobachtungen an Patienten mit 22q13.3 Deletion zeigten, dass das Gen ProSAP2/SHANK3, das für ein Strukturprotein der postsynaptischen Verdichtung erregender Synapsen kodiert, und in Kortex und Cerebellum des Gehirns exprimiert wird, defekt oder deletiert war. Aufgrund dieser Befunde ist dieses Gen ein guter Kandidat für dieses Syndrom. Die Deletion variiert stark in der Größe, nämlich von 130kb bis 9Mb.^{22,23,24} Aufgrund kürzlich gewonnener Erkenntnisse empfiehlt sich daher zur Untersuchung aller 22q13.3 Deletionen die Verwendung von subtelomeren Sonden distal des ARSA6Gens.^{24,25}

Die 22qter subtelomerespezifische Sonde (Klon n85a3) hybridisiert mit einer Sequenz im Gen ProSAP2/SHANK3. Durch sie ist die Identifizierung der am weitesten distal gelegenen 22q13.3 Deletionen möglich. Die DiGeorge Sonde ermöglicht die Identifizierung von Chromosom 22 und fungiert als Kontrollre.

Die TBX1-Region-Sonde, rot markiert, ist ca. 213 kb lang und enthält den D22S1627-Marker. Die begleitende 22qter-Subtelomer-spezifische Sonde (N85A3), grün markiert, dient als Kontrollsonde. In einer normalen Zelle, sollte es zwei rote und zwei grüne Signale geben (2R, 2G), während die Deletion eines Sonden-Targets zu einem roten Signal und zwei grünen Kontrollsignalen (1R, 2G) führt.

Kitkomponenten

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 tests) oder 100µl pro Röhrchen (10 tests)

Menge an TBX16 Bereichssonde: 7,3 ng/Test

Menge an 22q Sonde : 108,2 ng/Test

Die Sonde wird vorgekocht und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC). Die Sonden-DNA ist direkt markiert: die TBX1 - Sonde mit einem roten Fluorophor (spezifisch für das Texasrot-Spektrum) und die 22q - Sonde mit einem grünen Fluorophor (spezifisch für das FITC-Spektrum).

Gegenfärbung : 150 µl pro Röhrchen (15 Tests)

Die Gegenfärbung besteht aus DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Nur für die professionelle Verwendung.
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
3. Sondernmischungen enthalten Formamid, das teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und nicht mit der Haut in Berührung bringen. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
4. DAPI ist ein potentielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen , Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Richtlinien Ihrer Einrichtung zur Gefahrforsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

Das Aquarius-Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kitetikett angegeben ist, bei 620°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

Laboregeräte

- a) Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- b) Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl ÷ 200 µl
- c) Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C.
- d) Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml)
- e) Fluoreszenzmikroskop (siehe auch Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop)
- f) Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas
- g) Pinzette
- h) Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl
- i) Tischzentrifuge

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir die Verwendung einer 100 Watt Quecksilberdampfampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore optimal geeignet.

Probenvorbereitung

Das Kit ist für Verwendung an kultivierten, peripheren Blutzellen, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, ausgelegt und sollte nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbereitet werden.

Präparieren Sie mit zytogenetischen Standardmethoden Metaphasen-Spreitungspräparate. Für verbesserte FISH-Ergebnisse und bessere Morphologie der Chromosomen wird empfohlen, die präparierten Objektträger über Nacht bei Zimmertemperatur altern zu lassen.

FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers:

1. Zellprobe auf gereinigten Objektträger auftragen
2. Objektträger 2 Minuten in 2 x SSC (pH 7,0) einlegen.
3. Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min.
- Vordenaturierung
4. Nehmen Sie die Sonde aus dem 620°C Gefrierschrank und auf Zimmertemperatur aufwärmen lassen.
5. Durch wiederholtes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
6. 10 µl der Sonde entnehmen und auf den Objektträger mit der Zellprobe geben, mit einem Glasdeckgläschen 24 x 24 mm² abdecken und mit Gummikleberlösung versiegeln.
- Denaturierung
7. Objektträger auf eine Heizplatte mit 75°C (+/- 1°C) legen und 2 Minuten lang denaturieren.
- Hybridisierung
8. Den Objektträger in einer lichtdichten feuchten Kammer bei 37°C (+/- 1°C) **über Nacht hybridisieren**.
- Waschen nach der Hybridisierung
9. Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
10. Objektträger 2 Minuten in 0,4x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
11. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) bei RT waschen.
12. Objektträger abtropfen lassen und 10 µl DAPI Antifade auftragen.
13. Mit Deckgläschen abdecken und zur Farbentwicklung 10 Minuten im Dunkeln lagern.
14. 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 Raumtemperatur gelagert werden.

Empfehlungen zur Durchführung

1. Erhitzen oder anderweitiges Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfluoreszenz führen kann.
3. 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.
4. Die Konzentrationen der Waschlösungen (Stringenz), pH und Temperatur sind wichtige, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht-spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.

Kundendienst

Bitte wenden Sie sich an die Verkaufs- und Marketingabteilung von Cytocell.

ESPAÑOL

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas cultivadas o no cultivadas 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. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor y formamida para desnaturalizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturalizado, 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 tras varios lavados 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.

Especificaciones de la sonda

TBX1 marcaje rojo
22q marcaje verde

El síndrome DiGeorge¹ y una variedad de síndromes de malformación congénita, incluyendo los síndromes³ velocardiofacial (SVCF)² y de anomalía facial conotruncal³, comparten las características fenotípicas expresadas en el acrómino CATCH22 (insuficiencias cardíacas; anomalías faciales; hipoplasia tímica; hendidura del paladar; hipocalcemia) y deleción del cromosoma 22 en 22q11,2^{3,5,6}. Además, alrededor del 17% de los pacientes no sindrómicos con taras conotruncal han mostrado tener una microdeleción⁷ en 22q11.2. La incidencia de estas anomalías se estima en 1:4000 recién nacidos vivos⁸ y por tanto, la deleción de 22q11.2 representa uno de las anomalías genéticas más comunes. La región de 2 Mb asociada a la región crítica de DiGeorge (DGCR) está comúnmente delecionada en hasta un 90% de los pacientes^{9,10}. Dentro de la DGCR, se ha descrito una región crítica mas concreta (480-575 Kb)^{11,12}, la cual contiene numerosos genes, incluyendo el factor de transcripción TBX1, el cual es un firme candidato en las malformaciones de arco aórtico y anomalías relacionadas con aparato faríngeo y desarrollo del oído, descritos en DGS (Síndrome de DiGeorge)^{13,14,15}. Además, Tbx1 podría jugar un papel importante en el comportamiento¹⁶. Alrededor del 35% de los pacientes con DiGeorge desarrollan problemas psiquiátricos, principalmente esquizofrenia y trastorno bipolar.

Nota: síndrome de deleción 22q13.3

El síndrome de deleción 22q13.3 presenta un fenotipo reconocible caracterizado por hipotonía, pérdida o ausencia del habla expresiva, retraso mental moderado a profundo, crecimiento normal a acelerado y características dismórficas leves.¹⁷ Algunos deleciones del extremo del cromosoma 22q son visibles citogenéticamente. Sin embargo, se han presentado algunos casos de deleciones crípticas,^{17,18} que sugieren que la incidencia real de la deleción telomérica de 22q podría ser mayor de lo que en principio creemos.

Varias observaciones de pacientes con deleción de 22q13.3 han mostrado que el gen ProSAP2/SHANK3, que codifica una proteína estructural de la densidad postsináptica de sinapsis nerviosas y producidas en la corteza cerebral y el cerebelo¹⁹, podría ser interrumpido^{19,20,21} o delecionada²², haciendo del gen un candidato a ser la causa del síndrome. La deleción varía bastante en tamaño, de 130kb a 9Mb.^{22,23,24} Por eso, recientes hallazgos recomiendan el uso de sondas subteloméricas de 22q distal al gen ARSA para examinar todas las deleciones de 22q13.3.^{24,25}

La sonda subtelomérica específica 22qter (clone n85a3) se sitúa en el gen ProSAP2/SHANK3. Permite la identificación de la mayoría de las deleciones de 22q13.3 distales. La DiGeorge permite la identificación del cromosoma 22 y actúa como sonda de control.

La región TBX1 está marcada en rojo y abarca aproximadamente unas 213 Kb. Contiene al marcador D22S1627. La sonda control es de la región subtelomérica en 22qter (N85A3) y está marcada en verde.

En una célula normal, debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2V), mientras que la deleción de TBX1 resulta en una señal roja y dos señales verdes (1R, 2V).

Material proporcionado

Sonda: 50µl por vial (5 reacciones) o 100µl por vial (10 reacciones)

Cantidad de TBX1 Region probe: 7,3 ng/reacción

Cantidad de sonda 22q: 108,2 ng/reacción

La sonda se proporciona mezclada previamente y lista para utilizar en la solución de hibridación (Formamida; dextran sulfato; SSC). La sonda de ADN está directamente etiquetada: TBX1 con fluorocromo rojo (especifica para espectro Texas Red) y 22q con fluorocromo verde (especifica para el espectro FITC).

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones)

DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol))

Avisos y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y el contraste DAPI.
3. La solución de hibridación contiene formamida, que es una sustancia tóxica. No inhale gases ni permita el contacto con la piel. Lave guantes, bata de laboratorio y realice la manipulación con campana extractora. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
4. La DAPI puede producir cáncer. Manipule con cuidado; utilice guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de 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 manejo

El kit Aquarius debe almacenarse a -20°C hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del kit. Los viales de contraste y de sonda deben almacenarse en un lugar oscuro.

Equipo necesario pero no proporcionados

- a) Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C)
- b) Micropipetas de volumen variable rango (1µl -200µl)
- c) Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- d) Tubos de microcentrifugado (0,5 ml)
- e) Microscopio de fluorescencia (Lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia)
- f) Recipientes de cristal o de plástico
- g) Pinzas
- h) Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- i) Centrífuga

Recomendación para el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos x63 o x100 Plan-Apochromat. El filtro de triple banda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos.

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso con células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas en Carnoy que debe prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o de la institución. Preparar las extensiones de sangre cultivada en los portaobjetos del microscopio según los procedimientos citogenéticos estándar.

Protocolo FISH

Preparación del portaobjetos

1. Manche la concentración celular de la muestra en un portaobjetos limpio del microscopio
2. Sumerja el portaobjetos en 2 x SSC, pH 7,0 durante 2 minutos
3. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada uno
- Antes de la desnaturalización
4. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA
5. Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta
6. Saque 10µl de la sonda y colóquelo en el portaobjetos, cubra con un cubreobjetos de cristal de 24 x 24 mm y selle con solución de goma
- Desnaturalización
7. Coloque el portaobjetos en una placa caliente a 75°C (+/- 1°C) y desnaturalice durante 2 minutos
- Hibridación
8. **Híbride el portaobjetos durante la noche** en un contenedor húmedo y hermético a 37°C (+/- 1°C).
- Baños posthibridación
9. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
10. Lave el portaobjetos en 0,4 x SSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos
11. Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos
12. Seque el portaobjetos y aplique 10µl del DAPI Antifade
13. Cubra con el cubreobjetos y deje la preparación en la oscuridad durante 10 minutos para estabilizar el DAPI
14. Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos objeto de FISH se mantienen analizables durante 1 mes si se han almacenado en la oscuridad o por debajo de la temperatura ambiente.

Recomendaciones de procedimiento

1. No es recomendable calentar o envejecer los portaobjetos ya que puede reducir la señal de fluorescencia.
2. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.
3. Las concentraciones de lavado, el pH y la temperatura son importantes puesto que una baja stringencia en el lavado puede resultar en una fijación no específica de la sonda mientras que demasiada puede dar como resultado la falta de señal.

Ayuda al cliente

Póngase en contacto con el departamento de marketing y ventas de Cytocell.

Referencias/Bibliographie/Bibliografía/Literatur

1. Pinsky L. and DiGeorge, A.M. (1965) *J Pediatr* 66: 1049-54
2. Shprintzen, R.J. *et al* (1978) *Cleft Palate J* 15: 56-62
3. Burn, J. *et al* (1993) *J Med Genet* 30: 822-824
4. Wilson, D.L. *et al* (1993) *J Med Genet* 30: 852-856
5. Driscoll, D.A. *et al* (1992) *J Am Hum Genet* 50: 924-933
6. Burn, J. (1993) *ibid.*, p.822
7. Goldmuntz, E. *et al* (1993) *J Med Genet* 30: 807-812
8. Devriendt, K. *et al* (1998) *J Med Genet* 35: 789-790
9. Driscoll, D.A. *et al* (1990) *Am J Med Genet*. Suppl 47: A215
10. Scambler, P.J. *et al* (1991) *Genomics* 10: 201-206
11. Halford, S. *et al* (1993) *Hum Mol Genet* 2 (12): 2099-2107
12. Carlson, C. *et al* (1997) *Am J Hum Genet* 61: 620-629
13. Jerome, L.A. and Papaioannou V.E. (2001) *Nature Genet* 27: 286-291
14. Lidsay, E.A. *et al* (2001) *Nature* 409: 379-383
15. Arnold, J.S. *et al* (2006) *Hum Mol Genet* 15:1629-1639
16. Paylor *et al* (2006) *PNAS USA* 103:7729-7734
17. Phelan, M.C. *et al* (2001) *Am J Med Genet* 101(2): 91-99
18. Prasad, C. *et al* (2000) *Clin Genet* 57(2): 103-109
19. Beeckers T.M. *et al* (2002) *J Neurochem* 81(5): 903-910
20. Bonaglia M.C. *et al* (2001) *Am J Hum Genet* 69(2): 261-268
21. Anderlid B.M. *et al* (2002) *Hum Genet* 110(5): 439-443
22. Wilson H.L. *et al* (2003) *J Med Genet* 40(8): 575-584
23. Dupont C. *et al* (2003) French Speaking Cytogeneticists Association Congress
24. Luciani J. *et al* (2003) *J Med Genet* 40(9): 690-696
25. Chen C.P. *et al* (2003) *Prenat Diagn* 23(6): 504-508

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.



002/2010-06-24

Cytocell Ltd.
4 Technopark
Newmarket Road
Cambridge, CB5 8PB, UK.
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytocell.com
W: www.cytocell.com

DS#014/CE