



Instructions For Use

REF: LPU 016



Kallmann (KAL1)/ Steroid Sulphatase Deficiency (STS) 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.

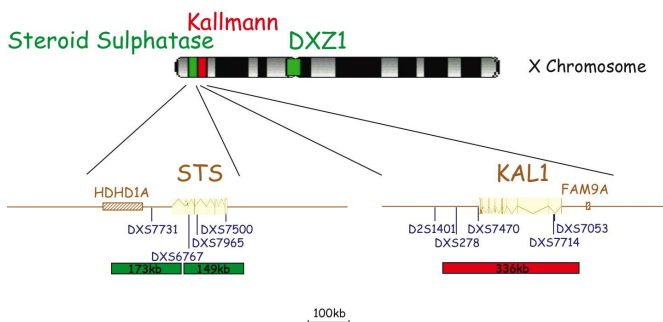
Probe Specification

KAL1 (Xp22.3) Red
STS (Xp22.3) Green
Xc: DXZ1 (Xp11.1-q11.1) control probe Green

Introduction

Kallmann syndrome (KS) is a developmental disease characterised by olfactory deficiency and hypogonadotropic hypogandism (HH), which is responsible for the absence of spontaneous puberty¹. It is a heterogeneous developmental genetic disorder affecting about 1 in 8,000 males and 1 in 40,000 females². Reports indicate three modes of inheritance: X-linked, autosomal dominant and autosomal recessive¹³⁴. It has been shown that mutations in KAL1 on Xp22.3 result in the X-linked form⁵. KAL1 consists of 14 exons and extends over 210 kb⁶. KAL1 gene abnormalities reported in patients with KS include missense and nonsense mutations, splice site mutations, intragenic deletions and submicroscopic chromosomal deletions involving the entire KAL1 gene⁷.

Steroid Sulphatase Deficiency (STS) (also known as X-linked Ichthyosis)⁸ is the second most common type of ichthyosis and one of the most frequent human enzyme deficiency disorders. Deficiency of the STS enzyme⁹ is known to be responsible for dark, adhesive and regular scaling of the skin. The STS gene is mapped at the distal part of the short arm of the X chromosome, a region which escapes X-chromosome inactivation and has the highest ratio of chromosomal deletions among all genetic disorders¹⁰. Complete deletions have been found in more than 90% of patients¹¹. The deletions can extend to involve neighbouring genes causing contiguous gene defect. Therefore, STS may be associated with KS¹².



The KAL1 Region probe labelled in red, is approximately 336 kb, it contains markers DXS278, DXS7470, DXS7714, DXS7053 and covers the entire KAL1 gene and flanking DNA. The accompanying STS Region probe, labelled in green, consists of two clones: a 173 kb clone containing marker DXS7731 and a 149 kb clone containing markers DXS6767, DXS7965, DXS7500. They cover the entire STS gene and flanking DNA. The X centromere probe: DXZ1 (Xp11.1-q11.1) probe, labelled in green, acts as a control. In the normal XY cell, there should be one red and two green signals (1R, 2G) or fusion of the red and green signals (yellow) and one green control signal (1Y, 1G), whilst a deletion of a probe target results in no red/yellow signal and one green control signal (0R, 1G) (KAL1/STS deletion) or (1R, 1G)(STS deletion) or (0R, 2G) (KAL1 deletion). In the normal XX cell, there should be two red and four green (2R, 4G) or two yellow and two green (2Y, 2G) signals, whilst a deletion of a probe target results in 1Y, 2G (KAL1/STS deletion) or 1Y, 1R, 2G (STS deletion) or 1Y, 3G (KAL1 deletion).

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100µl per vial (10 tests)
Amount of KAL1 probe: 12.2 ng/test
Amount of STS probe: 144.2 ng/test
Amount of Xc probe: 8.7 ng/test

The probe is provided premixed and ready to use in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC). The probe DNA is directly labelled: KAL1 Probe with a red fluorophore (specificity to the Texas Red spectrum) and the STS and Xc 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 and 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.

Comment

The KAL1 region probe may show faint cross-hybridisation to the Y chromosome, because of sequence homologies in this region.

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 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. 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 la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Caractéristiques de la sonde

KAL1 (Xp22.3) 6 Fluorochrome rouge
STS (Xp22.3) 6 Fluorochrome vert
Xc: DXZ1 (Xp11.1-q11.1) 6 Fluorochrome vert

Le syndrome de Kallmann (KS) est une atteinte du développement caractérisée par un déficit de la perception des odeurs associé à un hypogonadisme hypogonadotrope (HH). Cette dernière atteinte est responsable de retards de puberté¹. Il s'agit d'un désordre génétique hétérogène affectant 1/8000 garçons et 1/40000 filles². La littérature rapporte trois modes de transmission : récessif lié à l'X, autosomique dominant ou autosomique récessif¹³⁴. Il a été montré que des mutations dans le gène KAL1 en Xp22.3 résultent de la forme liée à l'X⁵. Le gène KAL1 est constitué de 14 exons et s'étend sur plus de 210 kb⁶. Les anomalies du gène KAL1 décrites chez des patients avec un syndrome de Kallmann incluent des mutations faux-sens, nonsense, ou sur les sites de splicing ; des délétions intragéniques et des délétions sub-microscopiques sur l'intégralité du gène KAL1⁷.

Le déficit en stéroïde sulfatase (STS) (auss appelé ichthyose liée à l'X)⁸ est le deuxième type d'ichtyose le plus commun et la déficience enzymatique la plus fréquente. Le déficit en enzyme STS⁹ est connu pour être responsable d'une peau présentant des squames noirâtres, un aspect adhésif et des plis réguliers. Le gène STS est situé dans la partie distale du bras court du chromosome X, une région échappant à l'inactivation de l'X et contenant le taux de délétions chromosomiques le plus élevé parmi toutes les atteintes génétiques¹⁰. Des délétions complètes du gène STS ont été retrouvées chez plus de

90% des patients atteints de déficit en stéroïde sulfatase¹¹. Les délétions peuvent s'étendre jusqu'à impliquer des gènes voisins entraînant un syndrome de gènes contigus. Ainsi, STS pourrait être associée à KS¹².

La sonde de la région KAL1, marquée en rouge, d'une taille approximative de 336 kb, contient les marqueurs DXS278, DXS7470, DXS7714 et DXS7053 et recouvre entièrement le gène KAL1 et ses régions adjacentes. La sonde de la région STS est quant à elle marquée en vert. Elle est constituée de deux clones : l'un de 173 kb et contenant le marqueur DXS7731 ; l'autre de 149 kb et contenant les marqueurs DXS6767, DXS7965 et DXS7500. Ces deux clones recouvrent entièrement le gène STS et ses régions adjacentes. La sonde centromérique DXZI (Xp11.1-q11.1) est marquée en vert et sert de contrôle.

Dans une cellule XY normale, on observe 1 spot rouge et 2 spots verts distincts (1R, 2G) ou la fusion du signal rouge de la sonde KAL1 et du signal vert de la sonde STS donnant 1 spot de fusion jaune (yellow, Y) et un spot vert de la sonde contrôle (1Y, 1G). Dans le cas d'une délétion KAL1/STS, on perd le signal rouge/jaune et on a toujours 1 spot vert du contrôle (0R, 1G). Dans le cas d'une délétion STS, on observe 1 spot rouge et 1 spot vert (1R, 1G). Dans le cas d'une délétion KAL1, on observe uniquement 2 spots verts (0R, 2G).

Dans une cellule XX normale, on observe 2 spots rouges et 4 spots verts (2R, 4G) ou 2 spots jaunes et 2 spots verts (2Y, 2G). Dans le cas d'une délétion KAL1/STS, on aura 1 spot jaune et 2 spots verts (1Y, 2G). Dans le cas d'une délétion STS, on aura 1 spot jaune, 1 spot rouge et 2 spots verts (1Y, 1R, 2G) et dans le cas d'une délétion KAL1, on aura 1 spot jaune et 3 spots verts (1Y, 3G).

Conditionnement

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

Concentration de sonde KAL1 : 12.2 ng/test

Concentration de sonde de contrôle STS : 144.2 ng/test

Concentration de sonde de contrôle Xc : 8.7 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 : KAL1 avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red) et STS, Xc avec un fluorochrome vert spectre FITC).

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

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES : 0,125µg/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) Jars 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'objectifs plan 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 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 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.
8. Sceller avec du rubber ciment 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 ciment
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.

Note importante

Avec la sonde KAL1, une légère hybridation croisée sur le chromosome Y peut être observée au niveau de séquences présentant des homologies avec la région KAL1.

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

KAL1 (Xp22.3) rosso
STS (Xp22.3) verde
Xc: DXZI (Xp11.1-q11.1) verde

La sindrome di Kallmann (KS) è un disturbo dello sviluppo caratterizzato da deficienza olfattiva e ipogonadismo ipogonadotropo (HH), responsabile dell'assenza di pubertà spontanea¹. Si tratta di un disturbo eterogeneo dello sviluppo di natura genetica che interessa circa 1 maschio su 8.000 e 1 femmina su 40.000². Studi fatti riportano l'esistenza di 3 modalità di trasmissione genetica: trasmissione legata al cromosoma X, trasmissione autosomica dominante e trasmissione autosomica recessiva^{1,2,4}. È stato dimostrato che mutazioni del gene KAL1 nella regione Xp22.3 da origine alla trasmissione legata al cromosoma X³. KAL1 è costituito da 14 esoni e si estende per più di 210 kb⁵. Anomalia a carico del gene KAL1 riscontrate in pazienti affetti da KS comprendono mutazioni missense? o mutazioni nonsense, mutazioni del sito di splicing, delezioni intrageniche e delezioni cromosomiche submicroscopiche che coinvolgono l'intero gene KAL1¹.

Il deficit di sulfatasi steroidea (STS) (conosciuto anche come ittiosi legata al cromosoma X)⁶ è il secondo tipo più comune di ittiosi e una delle più frequenti deficienze enzimatiche umane. Il deficit dell'enzima SDS⁶ è considerato responsabile della desquamazione scura, adesiva e irregolare della pelle. Il gene è mappato alla parte distale del braccio corto del cromosoma X, regione che sfugge all'innalzazione del cromosoma X ed è caratterizzata dalla maggiore percentuale di delezioni cromosomiche tra tutti i disturbi genetici¹⁰. Delezioni complete sono state riscontrate in più del 90% dei pazienti¹¹. Le delezioni possono estendersi anche ai geni vicini inducendo sindromi geniche contigue. Per questo motivo loSTS è talvolta associata alla KS¹².

La sonda complementare alla regione KAL1, marcata in rosso, è di circa 336 kb, contiene i marcatori DXS278, DXS7470, DXS7714, DXS7053 e ibridizza con l'intero gene KAL1 e con il DNA fiancheggiante. La sonda STS associata, marcata in verde, è formata da due cloni: il clone di 173 kb contiene il marcatore DXS7731 e il clone di 149 kb contiene i marcatori DXS6767, DXS7965, DXS7500. I due cloni insieme coprono l'intero gene STS e il DNA fiancheggiante. La sonda centromerica specifica per il cromosoma X, DXZI (Xp11.1-q11.1), marcata in verde, ha la funzione di sonda di controllo. Nella cellula normale XY, si dovrebbe osservare un segnale rosso e due segnali verdi (1R, 2G) o la fusione dei segnali rosso e verde (giallo) e un segnale di controllo verde (1Y, 1G) mentre una delezione a carico di una sonda target si traduce in nessun segnale rosso/giallo e un segnale di controllo verde (0R, 1G) (delezione KAL1/STS) o (1R, 1G)(delezione STS) o (0R, 2G) (delezione KAL1). Nella cellula normale XX, dovrebbero esserci due segnali rossi e quattro segnali verdi (2R, 4G) o due segnali gialli e due segnali verdi (2Y, 2G), mentre una delezione di una sonda bersaglio si traduce in 1Y, 2G (delezione KAL1/STS), 1Y,1R,2G (delezione STS) o 1Y,3G (delezione KAL1).

Materiale fornito

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

Quantità di sonda di KAL1 : 12.2 ng/test

Quantità di sonda STS : 144.2 ng/test

Quantità di sonda Xc : 8.7 ng/test

La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC). Il DNA della sonda è marcato direttamente: Sonda KAL1 marcata con un fluorocromo rosso (spettro Texas Red) e STS, Xc marcata con un fluorocromo verde (spettro FITC).

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

Il colorante di contrasto è il DAPI antifade (ES: 0,125µg/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, camice 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 camice 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 ad 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 apocromat 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 preparato 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 termostatici e degli incubatori 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.

Nota

La sonda specifica per la regione KAL1 può mostrare una debole cross-ibridazione con il cromosoma Y, a causa della presenza di sequenze omologhe in questa regione.

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 Waschvorgängen unter stringenter Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondenspezifikation

KAL1 (Xp22.3) Rot
STS (Xp22.3) Grün
Xc: DXZI (Xp11.1-q11.1) Grün

Kallmann-Syndrom (KS) ist eine Entwicklungsstörung, die durch Anomie und hypogonadotropen Hypogonadismus (HH) gekennzeichnet ist, der für das Ausbleiben der spontanen Pubertät verantwortlich ist¹. Das Syndrom ist eine heterogene genetische Entwicklungsstörung, die ca. 1 von 8.000 männlichen und 1 von 40.000 weiblichen Individuen betrifft¹. Berichte weisen auf drei Vererbungsmodi hin: X-chromosomal, autosomal dominant und autosomal rezessiv^{1,2}. Es wurde gezeigt, dass Mutationen in KAL1 auf Xp22.3 zu den X-chromosomalen Form führen³. KAL1 besteht aus 14 Exons und erstreckt sich über 210 kb⁵. Die KAL1-Gen-Anomalien, von denen bei Patienten mit KS berichtet wurde, umfassen Missense- und Nonsense-Mutationen, Splice Stellen-Mutationen, intragenische Deletionen und submikroskopische chromosomale Deletionen, die das gesamte KAL1-Gen umfassen¹.

Steroidulfatase-mangel-Syndrom (STS), auch bekannt als X-chromosomal-rezessive Ichthyosis⁹, ist die zweithäufigste Form der Ichthyosis und eine der häufigsten humanen Enzymmangelkrankungen. Ein Mangel an Steroidulfatase-Enzym ist bekanntermaßen verantwortlich für dunkle, hafende und regelmäßige Hautschuppen. Das Gen wurde auf den distalen Teil des kurzen Arms des X-Chromosoms kartiert 6 eine Region, die von der X-chromosomal Inaktivierung ausgenommen bleibt 6 und hat von allen genetischen Erkrankungen den größten Anteil an chromosomalen Deletionen¹⁰. Vollständige Deletionen sind in mehr als 90% der Patienten nachgewiesen worden¹¹. Die Deletionen können sich ausbreiten, sodass sie benachbarte Gene umfassen, was einen Defekt in einem angrenzenden Gen verursacht. Daher kann STS mit KS assoziiert sein¹².

Die KALI-Region-Sonde, rot markiert, ist ca. 336 kb lang, enthält die Marker DXS278, DXS740, DXS7714, DXS7053 und deckt das gesamte KALI-Gen sowie flankierende DNA ab. Die mitgesetzte STS-Region-Sonde, grün markiert, besteht aus zwei Klonen: einem 173 kb Klon, der den Marker DXS7731 enthält und einem 149 kb Klon, der die Marker DXS6767, DXS7965, DXS7500 enthält. Sie decken das gesamte STS-Gen und flankierende DNA ab. Die X-Zentromer-Sonde: DXZI (Xp11.1-q11.1), grün markiert, dient als Kontrolle. In einer normalen XY-Zelle, sollte es ein rotes und zwei grüne Signale (1R, 2G) geben, oder ein Verschmelzen der roten und grünen Signale (gelb) und ein grünes Kontrollsignal (1Y,1G), während die Deletion eines Sonden-Targets zur Abwesenheit des roten/gelben Signals und einem grünen Kontrollsignal führt (0R, 1G) (KALI/STS Deletion) oder zu (1R, 1G) (STS Deletion) oder zu (0R, 2G) (KALI Deletion). In einer normalen XX-Zelle sollte es zwei rote und vier grüne (2R, 4G) oder zwei gelbe und zwei grüne (2Y, 2G) Signale geben, während die Deletion eines Sonden-Targets zu 1Y, 2G (KALI/STS-Deletion) oder 1Y,1R,2G (STS-Deletion) oder 1Y,3G (KALI-Deletion) führt.

Kitkomponenten

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

Menge an KALI 6 Bereichssonde: 12.2 ng/Test

Menge an STS- Sonde : 144.2 ng/Test

Menge an Xc- Sonde : 8.7 ng/Test

Die Sonde wird vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextran-sulfat, SSC). Die Sonden-DNA ist direkt markiert: die KALI- Sonde mit einem roten Fluorophor (spezifisch für das Texasrot-Spektrum) und die STS, Xc- 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

- Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Nur für die professionelle Verwendung.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
- Sondenmischungen 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.
- DAPI ist ein potentielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Richtlinien Ihrer Einrichtung zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

Das Aquarius-Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kitiikett 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

Labogeräte

- Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl 6 200 µl
- Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C
- Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml)
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop)
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas
- Pinzette
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl
- 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.

FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers:

- Zellprobe auf gereinigten Objektträger aufbringen.
- Objektträger 2 Minuten in 2 x SSC (pH 7,0) einlegen.
- Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min.

Vordernaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem 620°C Gefrierschrank und auf Zimmertemperatur aufwärmen lassen.
- Durch wiederholtes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
- 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

- Objektträger auf eine Heizplatte mit 75°C (+/- 1°C) legen und 2 Minuten lang denaturieren.

Hybridisierung

- Den Objektträger in einer lichtdichten feuchten Kammer bei 37°C (+/- 1°C) über Nacht hybridisieren. Waschen nach der Hybridisierung
- Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Objektträger 2 Minuten in 0,4x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) bei RT waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 10 µl DAPI Antifade auftragen.
- Mit Deckgläschen abdecken und zur Farbentwicklung 10 Minuten im Dunkeln lagern.
- 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

- Erhitzen oder anderweitiges Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfuoreszenz führen kann.
- 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.
- 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.

Anmerkung

Die Sonde der KALI Region könnte eine geringfügige Kreuzhybridisierung mit dem Y-Chromosom aufgrund von Sequenzhomologien in dieser Region aufweisen.

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 desnaturizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturizado, 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

KALI (Xp22.3) marcaje rojo
STS (Xp22.3) marcaje verde
Xc: DXZI (Xp11.1-q11.1) marcaje verde

El Síndrome de Kallmann (KS) es una enfermedad del desarrollo, caracterizada por deficiencia del sentido del olfato e hipogonadismo hipogonadotrófico (HH), el cual es responsable de la ausencia de pubertad espontánea¹. El síndrome de Kallmann es un desorden heterocigoto que afecta a 1 en 8000 varones y a 1 en 40000 mujeres². Se han descrito tres tipos de herencia: Ligada al X, autosómica dominante y autosómica recesiva³⁻⁵. Se han descrito mutaciones en el gen KALI en Xp22.3, responsable de la herencia ligada al X⁶. KALI consta de 14 exones y abarca más de 210 Kb⁶. Las anomalías descritas para KALI en pacientes con Síndrome de Kallmann (KS) incluyen mutaciones missense y nonsense, mutaciones en sitios de splicing, deleciones intragénicas y deleciones submicroscópicas⁷.

La deficiencia de la sulfatasa de esteroides (STS), también conocido como Ictiosis ligada al X⁸, es la segunda causa más común de ictiosis y uno de las enfermedades endocrínicas más frecuentes en humanos. La deficiencia de la enzima SUD⁹ puede ser la responsable de las marcas y escamas en la piel. Este gene ha sido mapeado en la región distal del brazo corto del cromosoma X, que escapa a la inactivación cromosómica del X y tiene el mayor ratio de detección de todas las anomalías cromosómicas¹⁰. Deleciones completas se han visto en más de un 90% de los pacientes¹¹. Las deleciones pueden abarcar genes adyacentes, provocando defectos de genes contiguos. Como resultado, STS puede estar asociado a KS¹². El gen KALI está marcado en rojo y abarca aproximadamente 336 Kb. Contiene a los marcadores DXS278, DXS740, DXS7714, DXS7053 y abarca el gen KALI completamente. La sonda correspondiente a la región STS está marcada en verde y consta de 2 clones: uno de 173 Kb que contiene al marcador DXS7731 y otro de 149 Kb que contiene a los marcadores DXS6767, DXS7965, DXS7500. Estos clones abarcan el gen STS completamente y ADN flaqueante. La sonda control es centromérica del cromosoma X (DXA1 - Xp11.1-q11.1) y está marcada en verde.

En una célula normal XY, debería haber una señal roja y dos señales verdes (1R, 2V) o la fusión de una señal roja y otra verde (amarillo) y una señal verde del control (1A, 1V), mientras que la deleción de ambos genes resulta en una única señal verde y ninguna señal roja o amarilla (0R, 1V) (deleción KALI/STS), una señal roja y una señal verde (1R, 1V) para la deleción STS o ninguna señal roja y dos señales verdes (0R, 2V) para la deleción de KALI.

En una célula normal XX, debería haber dos señales rojas y cuatro señales verdes (2R, 4V) o dos amarillas y dos verdes (2A, 2V), mientras que la deleción de ambos genes resulta en una señal amarilla y dos señales verdes (1A, 2V), una roja y una amarilla y los verdes (1R, 1A, 2V) para la deleción del STS y ninguna roja y una amarilla y 3 verdes (0R, 1A, 3V) para la deleción de KALI.

Material proporcionado

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

Cantidad de KALI Region probe: 12.2 ng/reacción

Cantidad de sonda STS: 144.2 ng/reacción

Cantidad de sonda Xc: 8.7 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: KALI con fluorocromo rojo (especifica para espectro Texas Red) y STS, Xc 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

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

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

- Manche la concentración celular de la muestra en un portaobjetos limpio del microscopio
- Sumerja el portaobjetos en 2 x SSC, pH 7,0 durante 2 minutos
- Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada uno

Antes de la desnaturización

- Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA
- Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta
- 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

Desnaturización

- Coloque el portaobjetos en una placa caliente a 75°C (+/- 1°C) y desnaturalice durante 2 minutos

Hibridación

- Híbride el portaobjetos durante la noche en un contenedor húmedo y hermético a 37°C (+/- 1°C).

Baños posthibridación

- Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
- Lave el portaobjetos en 0,4 x SSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos
- Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos
- Seque el portaobjetos y aplique 10µl del DAPI Antifade
- Cubra con el cubreobjetos y deje la preparación en la oscuridad durante 10 minutos para estabilizar el DAPI
- 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

- No es recomendable calentar o envejecer los portaobjetos ya que puede reducir la señal de fluorescencia.
- 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.
- 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.

Nota

La sonda referente a la región KALI puede presentar hibridación cruzada con el cromosoma Y debido a secuencias homologas entre ambas regiones.

Ayuda al cliente

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

Referencias/Bibliographie/Bibliografía/Literatur

- Kallmann F.J., et al (1944) *Am J Ment Defic* 48: 203-236
- Hu Y., et al (2003) *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1157-1162
- Hockaday T.D., (1966) *Postgrad Med J* 42: 572-574
- White B.J., (1983) *Am J Med Genet* 15: 417-435
- Hardelin J-P., et al (1993) *Human Mol Genet* 2: 373-377
- Del Castillo L., et al (1992) *Nat Genet* 2: 305-310
- Izumi Y., et al (2001) *Endocr J* 48: 143-149
- Wells R.S., et al (1965) *Arch Dermatol* 92 (1): 1-6
- Koppe G., et al (1978) *Arch Dis Child*. 53 (10):803-806
- Hernandez-Martin A., et al (1999) *Br J Dermatol* 141 (4): 617-627
- Hazan C., et al (2005) *Dermatology Online* 11(4): 12
- Paige D.G., et al (1994) *Br J Dermatol* 131(5): 622-629

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.

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



003/2010-06-24

DS#016/CE