



Instructions For Use

REF: LPU 019



Smith-Magenis (RAI1) and Miller-Dieker (LIS1) 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.

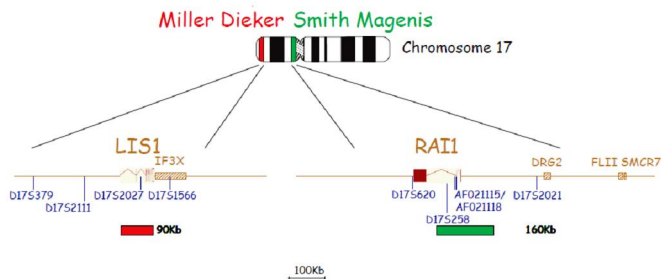
Probe Probe Specification
RAI1 (SMCR 17p11.2) Green
LIS1 (MDS/ILS 17p13.3) Red

Introduction

Smith-Magenis syndrome (SMS) is a multiple congenital anomaly syndrome characterised by mental retardation, neuro-behavioral abnormalities, sleep disturbances, short stature, minor craniofacial and skeletal anomalies, congenital heart defects and renal anomalies^{1,2}. It is one of the most frequently observed human microdeletion syndromes and associated with an interstitial deletion of the chromosome band 17p11.2^{1,2}. Molecular studies in SMS patients suggest a common deletion region spanning approximately 700 kb³. The proximal boundary is within a region of overlap between the FLI1 and LLLGL1 genes and the distal boundary within the PEMT gene³. Deletions or mutations in RAI1 (retinoic acid induced 1) gene, which lies within the 17p11.2 locus were associated with the syndrome^{3,4,5,6}. RAI1 was shown to be the primary gene responsible for most features of SMS^{7,8}.

Miller-Dieker syndrome (MDS) is a multiple malformation characterised by classical lissencephaly, a characteristic facial appearance and sometimes other birth defects⁹. It is associated with visible or submicroscopic rearrangements within chromosome band 17p13.3 in almost all cases¹⁰. Isolated lissencephaly sequence (ILS) consists of classical lissencephaly with no other major anomalies¹¹. Submicroscopic deletions of chromosome 17p13.3 have been detected in almost 40% of these patients¹⁰.

MDS is considered a contiguous gene deletion syndrome where deletion of physically contiguous genes leads to the complex phenotypic abnormalities seen in MDS. LIS1 is located at 17p13.3 and recognised as the causative gene responsible for the lissencephaly phenotype in both MDS and ILS^{12,13}. A deletion of MDS patients always involves LIS1 together with telomeric loci to in excess of 250 kb¹².



The SMCR probe is 160 kb and targets the RAI1 gene including the D17S258 marker. The MDS/ILS probe is 90 kb and targets the entire LIS1 gene of 80 kb. This probe product is dual labelled and intended to identify deletions of SMS and deletions or parental cryptic translocations of MDS/ILS patients. The two unique sequences provide each other with a control and allow identification of chromosome 17. In the normal cell, there should be two red and two green signals (2R, 2G), whilst a deletion of a probe target results in 1R, 2G (MDS) or 2R, 1G (SMS) or 1R1G.

Materials Provided

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

Amount of RAI1 (SMCR) probe: 86.6 ng/test

Amount of LIS1 (MDS/ILS) probe: 7.3 ng/test

The probe is provided premixed and ready to use in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC). The probe DNA is directly labelled: RAI1 (SMCR) with a green fluorophore

(specificity to the FITC spectrum) and LIS1 (MDS/ILS) with red fluorophore (specificity to the Texas Red 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 dechantillons 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. LeADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. LeADN 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, leADN non hybridé et leADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et leADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet la visualisation de la sonde hybridée sur leADN cible.

Caractéristiques de la sonde

RAI1 (SMCR 17p11.2) ó Fluorochrome rouge
LIS1 (MDS/ILS 17p13.3) ó Fluorochrome vert

Le syndrome de Smith-Magenis (SMS, Smith-Magenis Syndrome) est un syndrome d'anomalies congénitales multiples caractérisé par un retard mental, des troubles du comportement, des troubles du sommeil, une petite taille, des anomalies mineures cranio-faciales et du squelette, des malformations congénitales du cœur et des anomalies rénales^{1,2}. C'est un des syndromes de microdéletion le plus fréquemment observé, il est associé à une déletion interstitielle de la bande 17p11.2 du chromosome 7^{1,2}.

Estudios moleculares en pacientes con SMS sugieren una zona común de deleción que abarca aproximadamente 700 Kb. El límite proximal está en la región entre los genes FLII y LLLGL1 y el límite distal está junto al gen PEMT. Deleciones o mutaciones en el gen RAI1 (Retinoic acid induced 1), que se encuentra en 17p11.2 están asociadas con este síndrome. RAI1 parece ser el principal gen responsable de la mayoría de los rasgos de SMS.

Le syndrome de Miller-Dieker (MDS, Miller-Dieker Syndrome) est un syndrome malformatif multiple caractérisé par une lissencéphalie, un visage caractéristique et quelques fois d'autres troubles à la naissance⁹. Ce syndrome est associé dans la plupart des cas à des réarrangements visibles ou submicroscopiques de la région 17p13.3 du chromosome 17¹⁰. La séquence lissencéphalie isolée (ILS, Isolated Lissencephaly Sequence) consiste en une lissencéphalie classique sans aucune autre anomalie majeure¹¹. Des déletions submicroscopiques de la région 17p13.3 ont été détectées dans environ 40% de ces patients¹⁰.

MDS est un syndrome de gènes contigus dans lequel la déletion de ces gènes contigus entraîne le phénotype complexe rencontré dans le MDS. Le gène LIS1 est situé au niveau de la bande 17p13.3 et est reconnu comme étant le gène responsable du phénotype de lissencéphalie rencontré dans le MDS et dans le ILS^{12,13}. Une déletion chez des patients MDS implique toujours le gène LIS1 ainsi que des loci télomériques sur 250 kb¹².

La sonda corrispondente a SMCR es de 160 Kb y abarca el gen RAI1, incluyendo al marcador D17S258. La sonda MDS/ILS es de 90 kb y abarca el gen LIS1 de 80 kb. Esta sonda está doblemente marcada para la identificación de delecciones de SMS y delecciones o traslocaciones cripticas de los padres en pacientes MDS/ILS. Las dos secuencias únicas actúan como control una de la otra y permiten la identificación del cromosoma 17. En una célula normal, debería haber dos señales rojas y dos verdes (2R, 2V), mientras que si hay delección habrá una señal roja y dos verdes (1R, 2V) o dos rojas y una verde (2R, 1V) o una roja y una verde (1R, 1V).

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests) ou 100µl par tube (10 tests)
Concentration de sonde RAI1 (SMCR) : 86,6 ng/test
Concentration de sonde de contrôle LIS1 (MDS/ILS) : 7,3 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 : RAI1 (SMCR) avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red) et LIS1 (MDS/ILS) 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 de 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 d'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 pipétant plusieurs fois.
 7. Prélever 10 µl de sonde et la déposer sur la lame d'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 à 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* Hybridization - 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

RAI1 (SMCR 17p11.2) rosso
LIS1 (MDS/ILS 17p13.3) verde

La Smith-Magenis (SMS) è una sindrome congenita da anomalia multipla caratterizzata da ritardo mentale, anomalie neuro-comportamentali, disturbi del sonno, piccola statura, anomalie minori cranio-facciali e scheletriche, difetti cardiaci congeniti e anomalie nefritiche^{1,2}. Si tratta di una delle sindromi umane dovute a microdelezioni più frequentemente osservate ed è associata ad una delezione interstiziale della banda cromosomica 17p11.2³.

Studi molecolari in pazienti affetti da SMS suggeriscono una regione di delezione comune di circa 700 kb⁴. Il confine proximale cade all'interno di una regione di sovrapposizione tra i geni FLII e LLGL1 mentre il confine distale è all'interno del gene PEMT⁵. Delezioni o mutazioni nel gene RAI1 (retinoico acid induced 1), localizzato all'interno del locus 17p11.2, sono state associate alla sindrome^{3,4,5,6}. Il gene RAI1 è risultato essere il principale gene responsabile della maggior parte delle caratteristiche della SMS^{7,8}.

La sindrome di Miller-Dieker (MDS) è una malformazione multipla caratterizzata da lissencefalia classica (una sembianza facciale caratteristica) e talvolta, da altri difetti congeniti⁹. Tale sindrome è quasi sempre associata a riarrangiamenti di DNA, visibili o submicroscopici, all'interno della banda cromosomica 17p13.3¹⁰. La sequenza lissencefalia isolata (Isolated lissencephaly sequence - ILS) consiste di lissencefalia classica senza altre anomalie di rilievo¹¹. Delezioni submicroscopiche a carico del cromosoma 17p13.3 sono state rilevate in quasi il 40% di tali pazienti¹⁰.

La sindrome MDS è considerata una sindrome da delezione genica contigua in cui la delezione di geni fisicamente contigui porta al complesso di anomalie fenotipiche riscontrate in pazienti affetti da MDS. Il gene LIS1 è localizzato sul cromosoma 17p13.3 ed è considerato il gene responsabile del fenotipo lissencefalic sia nella sindrome MDS che nella sindrome ILS^{12,13}. In pazienti affetti da MDS, una delezione interessa sempre il gene LIS1 oltre a loci telomerici superiori a 250kb¹².

La sonda SMCR, di 160 kb, ha come bersaglio il gene RAI1 e comprende il marcatore D17S258. La sonda MDS/ILS misura 90kb ed ha come bersaglio l'intero gene LIS1 di 80kb. Tale sonda ha una doppia marcatura ed ha la funzione di identificare le delezioni caratteristiche della sindrome SMS e le delezioni o le traslocazioni criptiche

parentali in pazienti affetti da MDS/ILS. Le due sequenze uniche costituiscono ognuna un controllo per l'altra e permettono l'identificazione del cromosoma 17. Nella cellula normale, si osservano due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2G), mentre una delezione di una sonda bersaglio da origine a 1R, 2G (MDS), 2R, 1G (SMS) o 1R1G.

Materiale fornito

Sonda : 50µl per provetta (5 test) o 100µl per provetta (10 test)
Quantità di sonda di RAI1 (SMCR) : 86,6 ng/test
Quantità di sonda LIS1 (MDS/ILS) : 7,3 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 RAI1 (SMCR) marcata con un fluorocromo rosso (spettro Texas Red) e LIS1 (MDS/ILS) 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, 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.
8. **Incubare il vetrino per tutta la notte** in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C)
9. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetti 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 coprioggetti 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.

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 Waschküorgängen unter stringenten Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondenspezifikaion

RAI1 (SMCR 17p11.2) Rot
LIS1 (MDS/ILS 17p13.3) Grün

Das Smith-Magenis Syndrom (SMS) ist ein multiples Syndrom von angeborenen Anomalien, das durch geistige Retardierung, neuronal bedingten Verhaltensstörungen, Schlafstörungen, Kleinwüchsigkeit, kraniofaziale und Skelettanomalien, angeborene Herzfehler und Nierenanomalien gekennzeichnet ist^{1,2}. Es ist eines der am häufigsten beobachteten menschlichen Mikrodeletions Syndrome und mit einer interstitiellen Deletion von Chromosomenband 17p11.2 verbunden³.

Molekulare Untersuchungen bei SMS-Patienten weisen auf eine gemeinsame Deletionsregion hin, die ca. 700kb umspannt⁴. Die proximale Grenze befindet sich innerhalb einer Überlappungsregion zwischen den FLII- und LLGL1-Genen und die distale Grenze innerhalb des PEMT-Gen⁵. Deletionen oder Mutationen im RAI1 (Retinoic acid induced 1)-Gen, das innerhalb des 17p11.2-Locus liegt, wurden mit dem Syndrom in Verbindung gebracht^{3,4,5,6}. Es wurde gezeigt, dass RAI1 das hauptverantwortliche Gen für die meisten Merkmale von SMS ist⁷.

Das Miller-Dieker-Syndrom (MDS) ist eine multiple Fehlbildung, die durch klassische Lissencephalie, ein charakteristisches Aussehen des Gesichts und manchmal durch andere Geburtsfehler gekennzeichnet ist⁸. Es geht bei fast allen Fällen mit sichtbaren oder submikroskopischen Rearrangements innerhalb von Chromosomenband 17p13.3 einher⁹. Die isolierte Lissencephalie-Sequenz (ILS) besteht aus einer klassischen Lissencephalie ohne größeren weitere Anomalien¹¹. Bei nahezu 40% dieser Patienten wurden submikroskopische Deletionen von Chromosom 17p13.3 entdeckt¹⁰.

MDS wird als Deletionsyndrom von aneinander angrenzenden Genen betrachtet, wobei die Deletion von physikalisch aneinander angrenzenden Genen zu den komplexen phänotypischen Abnormitäten führt, die man bei MDS beobachtet. LIS1 lokalisiert im Bereich von 17p13.3 und wird als das verursachende Gen betrachtet, das sowohl bei MDS wie auch bei ILS für den Phänotyp der Lissencephalie verantwortlich ist^{12,13}. Eine Deletion bei MDS-Patienten betrifft immer LIS1 zusammen mit Loci am Telomer mit Größen von über 250 Kb¹².

Die SMCR-Sonde ist 160 kb lang und ist gegen das RAI1-Gen gerichtet, einschließlich des Markers D17S258. Die MDS/ILS Sonde ist 90 kb lang und ist auf das gesamte LIS1-Gen von 80 kb Länge gerichtet. Dieses Sondenprodukt ist zweifach markiert und soll Deletionen von SMS und Deletionen oder parentale kryptische Translokationen bei MDS/ILS-Patienten identifizieren. Die beiden einzigartigen Sequenzen dienen einander als Kontrolle und erlauben

la identificación de Chromosom 17. In einer normalen Zelle sollte es zwei rote (2R, 2G) Signale geben, während die Deletion eines Sonden-Targets zu 1R, 2G (MDS) oder 2R,1G (SMS) oder 1R,1G führt.

Kitkomponenten

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

Menge an RAI1 (SMCR) 6 Bereichssonde; 86,6 ng/Test

Menge an LIS1 (MDS/ILS) - Sonde 7,3 ng/Test

Die Sonde wird vorgegibt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC). Die Sonden-DNA ist direkt markiert: die RAI1 (SMCR) - Sonde mit einem roten Fluorophor (spezifisch für das Texasrot-Spektrum) und die LIS1 (MDS/ILS) - 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.
- Sondennmischungen 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 potentes 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 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

Laborgestelle

- Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl bis 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 auftragen
- Objektträger 2 Minuten in 2 x SSC (pH 7,0) einlegen.
- Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min.
- Vordenaturierung
- 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 Signalintensität 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 wichtig, 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 desnaturizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturizada, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina 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

RAI1 (SMCR 17p11.2) marcaje rojo
LIS1 (MDS/ILS 17p13.3) marcaje verde

El síndrome de Smith-Magenis (SMS) es un síndrome de múltiples anomalías congénitas caracterizado por retraso mental, anomalías en el comportamiento neurológico, trastornos del sueño, baja estatura, anomalías craneofaciales y esqueléticas leves y anomalías renales y coronarias congénitas^{1,2}. Es uno de los síndromes de microdelección más frecuente en humanos y se asocia con la delección intersticial de la banda cromosómica 17p11.2^{1,2}.

Estudios moleculares en pacientes con SMS sugieren una zona común de delección que abarca aproximadamente 700 Kb³. El límite proximal está en la región entre los genes FLII y LLGL1 y el límite distal está junto al gen PEMT. Delecciones o mutaciones en el gen RAI1 (Retinoic acid induced 1), que se encuentra en 17p11.2 están asociados con este síndrome^{4,5,6}. RAI1 parece ser el principal gen responsable de la mayoría de los rasgos de SMS^{7,8}.

El síndrome Miller-Dieker (MDS) es una malformación múltiple caracterizada por lisencefalia clásica, un aspecto facial característico y en ocasiones otras anomalías de nacimiento⁹. Se asocia con reorganizaciones visibles o submicroscópicas dentro de la banda cromosómica 17p13.3 en casi todos los casos¹⁰. La lisencefalia aislada (ILS) es una lisencefalia clásica sin otras anomalías mayores¹¹. Las delecciones submicroscópicas de la región 17p13.3 se han detectado en casi el 40% de estos pacientes¹⁰.

El MDS está causado por la delección del gen contiguo donde la delección de los genes físicamente contiguos da lugar a anomalías fenotípicas complejas encontradas en MDS. El LIS1 se localiza en 17p13.3 y se reconoce como el responsable de la lisencefalia fenotípica en ambos síndromes, MDS y ILS^{12,13}. Una delección de pacientes con MDS siempre implica LIS1 junto con los locus teloméricos superiores a 250kb².

Material proporcionado

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

Cantidad de RAI1 (SMCR) Region probe: 86,6 ng/reacción

Cantidad de sonda LIS1 (MDS/ILS): 7,3 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: RAI1 (SMCR) con fluorocromo rojo (específica para un espectro Texas Red) y LIS1 (MDS/ILS) con fluorocromo verde (específica 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 necesario pero no proporcionados

- Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C)
- Micropipetas de volumen variable rango (1µl -200µl)
- Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- Tubos 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
- Esérvelo 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 estrictencia 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/Literatur/Bibliografia

- Smith A.C.M. *et al* (1986) *Am. J. Hum. Genet.* **24**: 393-414
- Stratton R.F. *et al* (1986) *Am. J. Med. Genet.* **24**: 421-432
- Vlangos C.N. *et al* (2005) *Am. J. Med. Genet.* **132A**: 278-282
- Girirajan S. *et al* (2005) *J. Med. Genet.* **42**: 820-828
- Bi W. *et al* (2006) *Am. J. Med. Genet.* **140**(22):2454-63
- Slager RE *et al* (2003) *Nat. Genet.* **33**: 466-8
- Schoumans J. *et al* (2005) *Eur. J. Med. Genet.* **48**(3): 290-300
- Girirajan S. *et al* (2006) *Genet Med.* **8**(7): 417-427
- Dobyns, WB *et al* (1991) *Am. J. Hum. Genet.* **48**: 584-594
- Dobyns WB *et al* (1993) *J. Am. Med. Assoc.* **270**: 2838-2842
- Dobyns WB *et al* (1992) *Neurology.* **42**: 1375-1388
- Chong SS *et al* (1997) *Hum Mol Genet.* **6**(2): 147-155
- Lo Nigro C *et al* (1997) *Hum Mol Genet.* **6**(2): 157-164.

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

002/2010-06-24

DS#019/CE