

NÁVOD K POUŽITÍ PRO HYBRIDIZACI JEDNOBAREVNÉ MALOVACÍ SONDY

Potřebné reagenty/nedodávané:

- 20XSSC
- Destilovaná voda
- Formamid
- 70% Etanol skladovaný při -20°C
- 80%, 100% Etanol skladovaný při pokojové teplotě
- Tween 20

Příprava reagentů:

DEN 1

Etanolové řady

Připravte 70%, 80% a 100% etanol a skladujte 70% ethanol při teplotě -20 °C a 80% a 100% etanol při pokojové teplotě.

Denaturační roztok (70% formamide /2SSC)

Smíchejte 35 ml formamidu, 10 ml destilované H₂O a 5ml 20XSSC. Upravte pH na 7.0 pomocí HCL, zahřejte na 72°C.

DEN 2

Rychlé promytí (roztok 0.4 X SSC)

Smíchejte 1 ml 20X SSC se 49 ml destilované vody

Celkem: 50 ml

Dobře promíchejte a zahřejte na 74°C.

Promývací roztoky II (4 X SSC/0.1%Tween 20)

Smíchejte 100 ml 20X SSC se 400 ml destilované vody a 0.5ml Tween 20

Celkem: 500 ml

PROTOKOL

Den 1

A) Denaturace chromozomů

1. Vložte sklíčka do 2XSSC při pokojové teplotě na 2 minuty a poté vysušte ve vzestupné etanolové řadě: 70 %, 80 % a 100 %, vždy po 2 minutách. Nechte uschnout na vzduchu.
2. Zahřejte 40 ml denaturačního roztoku na 70 °C (± 2 °C) ve skleněné Coplinově nádobě. Vložte sklíčka do denaturačního roztoku na 1,5 minuty. **NEPŘEDENATURUJTE**, některé vzorky se denaturují pouze 60 sekund. K denaturaci lze použít také ohřívací plotýnku: naneste 100 ml denaturačního roztoku na sklíčko, přikryjte krycím sklíčkem a vložte na 1,5 minuty do ohřívače sklíček při teplotě 72 °C (± 2 °C).
3. Sklíčka okamžitě vložte do studeného 70% a 80% a 100% etanolu, vždy na 2 minuty. Nechte uschnout na vzduchu.

B) Denaturace a hybridizace sondy

1. Sondu krátce odstřed'te, odeberte 10 μ l na každé sklíčko. Sondu denaturujte inkubací při 80 °C ve vodní lázni po dobu 7 minut.
2. Vložte do vodní lázně při teplotě 37 °C na 10 minut.
3. Přidejte 10 μ l denaturované sondy k denaturovanému chromozomovému preparátu.
4. Na směs sondy a preparátu položte krycí sklíčko o rozměrech 18 x 18 mm² a dávejte pozor, aby se pod krycím sklíčkem nevytvořily vzduchové bubliny. Okraje utěsněte gumovým lepidlem. Vložte sklíčko do zvlhčené komory nebo nádoby a vložte do inkubátoru nebo pece nastavené na 37 °C na 12–16 hodin.

Alternativně: Lze použít ko-denuraci: naneste 10 μ l sondy, přikryjte krycím sklíčkem (18 × 18 mm) a utěsněte gumovým tmelem. Denaturujte vzorek a sondu společně na ohřívací plotýnce při teplotě 74 °C po dobu 4 minut. Umístěte do inkubátoru nebo pece nastavené na teplotu 37 °C na 12–16 hodin.

Den 2

D) Detekce

Poznámka: Během celého postupu by měla sklíčka zůstat vlhká a chráněná před přímým světlem.

1. Vyjměte sklíčka ze zvlhčené komory a opatrně odstraňte gumové lepidlo.
2. Přeneste sklíčka do Coplinovy nádoby obsahující 0,4XSSC. Sklíčka promývejte ve 0,4XSSC při teplotě 74 °C (± 2 °C) po dobu 3–5 minut. Sklíčka ponořte do promývacího roztoku II (4XSSC/0,1 % Tween 20) po dobu 2 minut.
3. Naneste 20 μ l roztoku DAPI/Antifade a přikryjte povrch krycím sklíčkem (24 × 60 mm²). Snažte se odstranit všechny vzduchové bubliny, které se mohly vytvořit.