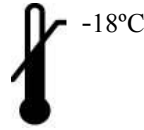




## Návod k použití

IntellMed, s.r.o.,  
Václavské náměstí 820/41  
110 00 Praha 1  
IČ: 27780317  
DIČ: CZ27780317

Principem fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je hybridizace fluorescenčně značených sond na základě pravidla komplementarity přímo na vyšetřovanou DNA a tím vizualizace cílových úseků vyšetřované DNA. Centromerické sondy hybridizují v oblasti centromer lidských chromozomů a využívají se k enumeraci chromozomů a jejich početních odchylek (monosomie, polysomie atd.). Lokusově specifické sondy hybridizují ke konkrétním, cíleným úsekům DNA a využívají se tedy k určení statusu (amplifikace, delece, translokace atd.) jednotlivých genů.

### 1 Potřebné chemikálie a vybavení:

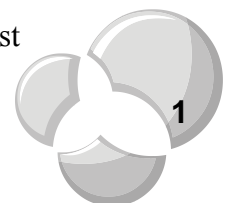
- SSC roztok
- NP-40
- Etanol
- Purifikovaná voda (deionizovaná či destilovaná)
- Kyselina octová a metanol
- Rubber cement
- Vlhká komůrka
- Vodní lázeň
- Vyhřevná plotýnka (termoblok)
- Inkubátor (37°C)
- Montážní médium s DAPI
- Fluorescenční mikroskop s příslušným filtrem

### 2 Příprava potřebných roztoků

- **70%, 85% a 96% etanol** - v případě použití klasických barvicích nádobek (Copplin jar) je dostačující množství 70 ml každého roztoku etanolu
- **20xSSC, pH 5.3**
- **Denaturační roztok:** 49 ml formamidu, 7 ml 20xSSC, 14 ml purifikované vody upravit pH na 7-8 skladovat při teplotě 2-8°C (max. 7 dnů); před použitím vyhřát na 73±1 °C
- **Promývací roztok I (0,4x SSC / 0,3% NP-40):** 20 ml 20xSSC, 3 ml NP-40, doplnit do 1 litru purifikovanou vodou upravit pH na 7,0-7,5 skladovat při laboratorní teplotě (max. 6 měsíců); před použitím vyhřát na 73 ± 1 °C
- **Promývací roztok II (2x SSC / 0,1% NP-40):** 100 ml 20xSSC, 1 ml NP-40, doplnit do 1 litru purifikovanou vodou upravit pH na 7,0 ± 0,2 °C skladovat při laboratorní teplotě (max. 6 měsíců)

### 3 Postup

- Pokud použijeme čerstvý materiál (tkáň, buněčnou linii atd.) je třeba po nanesení na podložní sklíčko (nátěr, otisk, cytospin) a zaschnutí preparát zafixovat ve směsi metanol a kyselina octová, v poměru 3:1, po dobu 10 minut. Fixační směs připravujeme vždy před použitím. Po fixaci necháme preparát volně oschnout.
- Pokud použijeme parafinové řezy, je potřeba preparát nejdříve deparafinizovat a provést pretreatment vzorku.





Po odpovídajícím zpracování konkrétního vzorku lze pokračovat následujícím postupem:

1. Preparáty inkubujeme v denaturačním pufru po dobu 5 minut, při teplotě  $73 \pm 1^\circ\text{C}$ .
2. Ihned po vyjmutí vložíme preparát do roztoku 70% etanolu na 1 minutu, poté na minutu do 85% etanolu a nakonec do 96% etanolu, kde můžeme preparát nechat do té doby, než budeme připraveni nanést sondu (nejméně však jednu minutu).
3. Skla vyjmeme z etanolu, lehce osušíme přitisknutím hrany skla na savou podložku, umístíme na termoblok o teplotě  $45-50^\circ\text{C}$  a necháme odpařit zbývající etanol (3-5min).
4. Naneseme sondu v takovém množství, aby překryla testovaný vzorek, a překryjeme vyčištěným krycím sklíčkem (na krycí sklíčko velikosti max.  $22 \times 22$  mm, použijeme 10 $\mu\text{l}$  sondy). Po zalepení je třeba krycí sklíčko pokrýt vhodným rubber cementem.
5. Inkubujeme přes noc při  $37^\circ\text{C}$  ve vlhké komůrce

#### Odmytí nenavázané sondy

1. Odlepíme krycí sklíčko a preparát ponoříme do promývacího roztoku I (0,4x SSC/ 0,3% NP-40), vyhřátého na  $73 \pm 1^\circ\text{C}$ . Asi 3-5 s sklíčko s preparátem v roztoku lehce protřepáváme. Inkubujeme 2 minuty.
2. Přeneseme do promývacího roztoku II (2x SSC/0,1% NP-40), opět asi 3-5 s protřepáváme a inkubujeme 30 sekund.
3. Lehce osušíme přitisknutím hrany skla na savou podložku a necháme bez přístupu světla volně zaschnout.
4. Naneseme DAPI, jehož smyslem je podbarvit jádra tak, aby je bylo možno pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu. Pokud nepoužíváte komerční DAPI barvivo/montážní medium, lze preparáty např. barvivem Hoechst. Přebytečné barvivo je pak nutno odmyt a použít montážní medium, jako je např. pufrovaný glycerol.
5. Překryjeme krycím sklíčkem a odečítáme ve fluorescenčním mikroskopu.

Poznámka: Pokud používáte metodu kodenaturace, naneste sondu na sklo s vyšetřovaným materiálem, přikryjte krycím sklem, zalepte vhodným rubber cementem a nastavte program na  $85^\circ\text{C}$  - 1 min a  $37^\circ\text{C}$  pro inkubaci přes noc (parafinové řezy), nebo program na  $75^\circ\text{C}$  - 1 min a  $37^\circ\text{C}$  - inkubace přes noc (ostatní preparáty).

#### 4 Možné problémy a jejich řešení

Problém	Možné řešení
Zkřížená hybridizace	Zvyšte teplotu promývacího roztoku I o $2^\circ\text{C}$ . Snižte teplotu denaturace o $2^\circ\text{C}$ .
Slabé či žádné signály	Zvyšte teplotu denaturace o $2^\circ\text{C}$ . Prodlužte dobu hybridizace. Zkraťte dobu odmyváání. Ověřte pH roztoků. Ověřte, zda preparát se sondou či sonda samotná nebyla vystavována přímému světelnému záření. Ověřte, zda byla sonda uchovávána při $-20^\circ\text{C}$ . Po fixaci ponořte preparát na maximálně 1 minutu do 70% kyseliny



	<p>octové a poté nechte zaschnout. Tento krok doporučujeme zejména u hybridizace na mitotické preparáty, u kterých nedošlo k úplnému odstranění cytoplazmatických membrán.</p> <p>Preparát je staršího data a nebyl uchováván při <math>-80^{\circ}\text{C}</math> (neplatí pro parafinové řezy).</p>
Difúzní signály	<p>Snižte teplotu denaturace o <math>2^{\circ}\text{C}</math>.</p> <p>Zkraťte dobu denaturace o 1 minutu.</p> <p>Ověřte pH roztoků.</p>
Špatná morfologie vzorku	<p>Snižte teplotu denaturace o <math>2^{\circ}\text{C}</math>.</p> <p>Zkraťte dobu denaturace o 1 minutu.</p> <p>Prodlužte dobu fixace preparátu.</p>
Nečistoty na pozadí či „zamlžení“ vzorku po hybridizaci a promytí	<p>Došlo ke smíšení vodného roztoku s montážním médiem. Po odmytí vzorku hybridizaci nechte preparát dokonale zaschnout.</p> <p>Ověřte pH odmývacích roztoků a denaturačního pufru.</p> <p>Prodlužte dobu odmývání po hybridizaci.</p>

## 5 Bezpečnostní informace

DNA sondy obsahují:

**formamid**, který je teratogenní. Zamezte proto kontaktu sondy s kůží. Při práci používejte ochranný oděv a rukavice.



R61  
S24, S 25, S35, S36, S 37, S 39, S 45, S 53

Pro užití DNA sond je potřeba následujících nebezpečných látek, které však nejsou součástí výrobku ani nejsou spolu s výrobkem dodávány:

**NP-40**, součást promývacích roztoků, je dráždivý stejně jako **DAPI** barvivo. Zamezte proto kontaktu sondy, promývacích roztoků a DAPI s kůží a nevdechujte. Při práci používejte ochranný oděv a rukavice.



R 36, R 38, R 37 S 26, S 27, S 28, S 29, S 30, S 33, S 46,

## 6 Likvidace nepotřebovaného nebo proexspirovaného výrobku

Nepotřebovaná činidla a odpad se obecně řadí mezi zvláštní odpad a likvidují se v souladu s celostátními a místními předpisy. S kontaminovanými odpady musí být zacházeno stejně jako s produktem samotným.

