



**PROTOCOLO para reacción de Hibridación in situ
Fluorescente (FISH) sobre extendidos celulares**

Producto:

1. Sonda de DNA específico marcado con fluorocromo.
2. Buffer de Hibridación
3. Reactivos para preparar Solución de Montaje (DAPI + Antifade)

Estas sondas están diseñadas para utilizar sobre células en interfase o metafase obtenidas mediante procedimientos citogenéticos estándares, ver: The ACT Cytogenetics Laboratory Manual. 2nd ed. New Cork: Raven Press; 1991.

Materiales extras requeridos:

- 2XSSC*
- Soluciones de etanol 70, 90 y 100%
- Pepsina*
- Detergente no-iónico
- pH-metro o papel para medir pH
- Cubreobjetos
- Soluciones de enjuague (1 y 2)*
- Cemento de contacto removible
- Tubos 0,2 o 0,5ml
- Recipientes para enjuagues (Coplin)
- Aceite de inmersión
- Cámara húmeda
- Termómetro

*ver protocolos de preparación mas abajo.

Equipamientos requeridos:

- Microscopio de fluorescencia: No siempre un microscopio utilizado en reacciones de inmunohistoquímica u otro tipo de análisis con fluorescencia resulta adecuado. Los requerimientos para observar correctamente una reacción de FISH son los siguientes:
 - o Fuente de Excitación: Se recomienda una lámpara de mercurio de 100 Watt con una vida útil de 200horas. Es necesario que una vez colocada, la lámpara sea alineada correctamente.
 - o Objetivos: Para la ubicación del blanco (interfases o metafases) se recomiendan objetivos de 10, 20 y/o 40X. Para el análisis de la reacción es necesario un objetivo de inmersión especial para fluorescencia con una apertura numérica $\geq 0,75$.
 - o Filtros de excitación-emisión: Cada fluorocromo observado requerirá de diferentes filtros. Los requerimientos para nuestras sondas se muestran en el cuadro a continuación:

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Verde	501	523
Rojo	550	570
Rojo Texas*	589	615
DAPI	350	470

*Sólo por pedido específico o en diseños de ciertas sondas

- Micropipetas (1-10µl o similar)

- Microcentrífuga

- Vórtex
- Timer
- Baño de inmersión
- Incubadora 45°C)
- Placa termostática o hibridizador

Preparación de soluciones extras:

2XSSC:

Cloruro de Sodio (NaCl) 300mM
Citrato de Sodio (Na₃C₆H₅O₇) 30mM
Ajustar a pH:7 con Acido clorhídrico (HCl) 1N

Pepsina:

Diluir 0,5mg de pepsina en 1ml de Acido clorhídrico (HCl) 0,01N

Enjuague 1:

En un coplin adecuado para 80ml, agregar 16ml de 2XSSC, 64ml de agua bidestilada y 0,240 ml de detergente no-iónico.

Enjuague 2:

En un coplin adecuado para 80ml, agregar 80ml de 2XSSC y 0,080ml de detergente no-iónico.

Precauciones y advertencias (Leer atentamente):

- Reactivo analítico. Para uso en investigación solamente. Este producto NO está probado para uso diagnóstico o terapéutico.
- Las reacciones así como la interpretación de las mismas deben ser realizadas por personal idóneo debidamente entrenado.
- Todas las muestras biológicas deberían ser tratadas como posibles transmisores de agentes infecciosos.
- Se debe evitar la exposición de la muestra a ácidos o bases en alta concentración así como también al calor extremo. Estos factores dañan el DNA y pueden causar el fallo de la reacción de FISH.
- Una vez extraída la alícuota a utilizar, la sonda debe ser guardada nuevamente a -20°C .
- La falla u omisión de cualquiera de los pasos del protocolo detallado más abajo puede generar resultados erróneos o inaceptables.
- Las soluciones de enjuague pos-hibridación (ver protocolo) deben ser renovadas periódicamente debido a que son propensas de contaminación.
- El buffer de hibridación contiene formamida, un teratógeno, por lo que debe evitarse el contacto con la piel y las mucosas.
- Se recomienda el uso de guantes y chaqueta de trabajo durante todo el proceso.
- Es necesario controlar siempre la temperatura de las soluciones que se utilizan calientes.
- Todos los materiales peligrosos deben ser descartados de acuerdo a las normativas de su institución.

Protocolo de utilización

Consideraciones previas:

- Durante el desarrollo de este protocolo **NO ES NECESARIO** trabajar en condiciones de semi-obscuridad. Las sondas LIVE están desarrolladas para no perder su fluorescencia durante periodos medios de exposición a luz artificial.
- Si bien es altamente recomendado mantenerlas a -20°C , las sondas LIVE no pierden su actividad después de 24hs a temperatura ambiente.
- El buffer de hibridación provisto permite obtener resultados con 30 minutos de hibridación. Tiempos de Hibridación mayores a 30 minutos no afecta la calidad de la reacción.
- **Se recomienda utilizar 45°C para hibridaciones de 30 minutos hasta aproximadamente 8 horas. Si la hibridación será revelada al día siguiente la temperatura debe ser de 37°C**

Extendido celular

Es muy importante que durante la realización del extendido celular NO se utilice calor extremo (flameado, secado a la llama, etc.)

Pre-tratamiento

En general las sondas LIVE funcionan bien sin ningún tipo de pre-tratamiento, sin embargo, en ocasiones la presencia de restos celulares sobre el extendido o bien la hibridación de muestras como mucosa yugal, amniocitos, etc., requiere realizar una limpieza del extendido afín de exponer mejor el DNA.

- Sobre la región a hibridar agregar una gota de Pepsina 0,5mg/ml (diluída en HCl 0,01N). Agregar un cubreobjetos.
- Incubar en cámara húmeda a 37°C (los tiempos varían con la severidad del tratamiento, siendo el mínimo 5 minutos).
- Descartar el cubreobjetos y enjuagar el extendido bajo agua corriente.
- Deshidratar en etanol en series: 70, 90 y 100% 1 minuto en cada uno.
- Dejar secar totalmente.

Desnaturalización conjunta (Co-desnaturalización)

Preparación de la sonda:

- Descongelar la sonda, homogeneizar en Vórtex
- Centrifugar brevemente
- Atemperar el buffer de hibridación
- En un tubo de PCR agregar:
 - 7µl de Buffer de hibridación
 - 1µl de sonda 1
 - 1µl de sonda 2
- Homogeneizar en Vórtex
- Centrifugar brevemente

De utilizarse sólo 1 sonda, no es necesario agregar agua.

Co-desnaturalización:

- Sobre el reverso del portaobjetos marcar la región a hibridar (los 8 o 9µl preparados hibridan una región aproximada de 22x22mm).
- Agregar la solución de sonda sobre la región marcada
- Colocar un cubreobjetos de tamaño adecuado
- Sellar los bordes del cubreobjetos con cemento de contacto removible
- Colocar el portaobjetos así montado sobre una superficie caliente (hibridador, plancha termostática, etc.). En ocasiones es conveniente colocar una gota de agua sobre la placa calefactora y luego colocar sobre ésta el portaobjetos montado, de esta forma se logra una película de agua entre el portaobjetos y la superficie caliente optimizando la transferencia de temperatura.

El tiempo de co-desnaturalización varía con el envejecimiento del extendido, quedando sujeto a optimización de acuerdo a la rutina en el procesado y almacenamiento de extendidos celulares de cada laboratorio. A continuación se sugieren parámetros aproximados:

- **8-12 minutos 71°C:** Extendidos celulares realizados el mismo día o guardados inmediatamente a -20°C como máximo 2 meses (ver recuadro).
- **15 minutos 71°C:** A partir del punto anterior se recomienda aumentar el tiempo gradualmente hasta un máximo de 15 minutos.

Preparación de extendidos celulares:
Para optimizar resultados se recomienda:

1. Realizar el extendido (no sobrecalentar con llama!).
2. Envejecer a 37-45° durante 30 minutos.
3. Realizar FISH o mantener a -20°C.

Hibridación: El buffer de hibridación LIVE, permite obtener resultados para cualquier tipo de sonda con apenas 30 minutos de hibridación.

Colocar el portaobjetos en cámara húmeda. Incubar durante un mínimo de 8 horas o toda la noche a 37°C.

Reacción de Hibridación in situ Fluorescente

Revelado

Pasos previos

- Por lo menos 30 minutos antes, calentar la solución de **enjuague 1** a 71°C (+/-1°C) corroborando con un termómetro calibrado la temperatura dentro del recipiente.
- Atemperar la solución de **enjuague 2** a temperatura ambiente.
- Atemperar el contracolorante a utilizar a temperatura ambiente.

Enjuague del exceso de sonda

- Extraer el portaobjetos de la cámara húmeda.
- Quitar cuidadosamente el cemento de contacto o la lámina de Parafilm®.
- Sumergir el portaobjetos en una solución de 2XSSC a temperatura ambiente hasta que el cubreobjetos se desprenda (2 a 5 minutos).
- Sumergir el portaobjetos en el **enjuague 1** durante 2 minutos exactamente.
- Sumergir el portaobjetos en el **enjuague 2** un mínimo de 1 minuto.
- Drenar levemente el exceso de líquido.
- Colocar sobre la región hibridada una gota (aprox. 20µl) de contracolorante (conteniendo la solución de Antifade).
- Agregar un cubreobjetos de tamaño mayor a la región hibridada.
- Drenar el exceso de contracolorante presionando suave y uniformemente con papel absorbente.
- Eliminar posibles burbujas de aire presionando suavemente con la punta de un tip.
- La reacción está lista para ser analizada.



Protocolo de utilización

