

Флуоресцентный зонд для локализации на хромосомах теломерных последовательностей (TTAGGG)_n

Описание.

Продукт представляет собой раствор, содержащий: синтетическую олигонуклеотидную последовательность ДНК, комплементарную теломерным районам хромосом (TTAGGG)_n, ковалентно связанную с флуорофором 6-карбоксивисфлуоресцеин (6-FAM); буфер для гибридизации, включающий тРНК, декстран сульфат, формамид, цитрат натрия и хлорид натрия, деионизированную воду. Спектр возбуждения флуорофора имеет максимум в области 495 нм и длина волны излучения составляет 517 нм (зеленая флуоресценция). Предназначен для локализации теломерных последовательностей (TTAGGG)_n на цитогенетических препаратах хромосом для клеток, несущих более 1% теломерных последовательностей в геноме.

Принцип метода.

FISH (флуоресцентная гибридизация in situ) - это метод, который позволяет визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот на цитологическом препарате. В частности, FISH включает в себя точный отжиг одноцепочечного меченого флуорофором ДНК-зонда к комплементарной последовательности-мишени на препарате. Гибридизация зонда визуализируется методом флуоресцентной микроскопии. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов квалифицированным специалистом.

Состав.

1 пробирка (20 мкл), содержащая олигонуклеотидный зонд (100 нг/мкл).

1 пробирка (150 мкл), содержащая буфер для гибридизации, включающий тРНК, декстран сульфат, формамид, цитрат натрия и хлорид натрия (pH 7,2).

1 пробирка (100 мкл), содержащая стерильную воду без примеси нуклеаз

Условия хранения.

Обе пробирки, содержащие олигонуклеотидный зонд и буфер для гибридизации необходимо хранить при температуре -20°C в темноте.

Перечень дополнительных необходимых материалов.

20x SSC (pH 7,0-7,2): 3М NaCl / 0,3М цитрат натрия

10x PBS (pH 6,8-7,2): 1,4М NaCl / 27мМ KCl / 65мМ Na₂HPO₄ / 15мМ KH₂PO₄

РНКаза А (10 мг/мл) в 10мМ Tris-HCl (pH 7,5) / 15мМ NaCl

10% раствор пепсина в стерильной воде

Соляная кислота

Этанол

10% раствор формальдегида

Неионный детергент Tween 20

Парафильм

Покровные стекла

Резиновый клей марки А

Закрывающая среда для флуоресцентной микроскопии

Протокол.

Предварительная обработка препаратов:

1. Подготовить растворы: 2xSSC (5 мл 20xSSC и 45 мл деионизированной воды), 1xPBS (5 мл 10xPBS и 45 мл деионизированной воды), 1% формальдегид на 1xPBS (5 мл 10xPBS, 5 мл 10% раствора формальдегида и 40 мл деионизированной воды), 0,01М HCl (из концентрированной HCl и деионизированной воды), растворы этанола 50%, 70%, 96%.

2. Приготовить рабочие растворы ферментов: 0,005% раствор пепсина в 0,01М HCl (из 10% раствора пепсина), 100 мкг/мл РНКазы в 2x SSC (из 10 мг/мл раствора свободной от ДНКаз РНКазы А в 10мМ Tris-HCl (pH 7,5) / 15мМ NaCl).

3. Поместить подготовленные заранее дегидратированные препараты на 5 минут в 2xSSC.

4. Нанести на влажные препараты по 200 мкл рабочего раствора РНКазы и накрыть кусочком парафильма, инкубировать при 37°C 1 час.

5. Поместить препараты на 5 минут в 2xSSC.

6. Нанести на влажные препараты по 200 мкл рабочего раствора пепсина и накрыть кусочком парафильма, инкубировать 10 мин. **ВНИМАНИЕ: время засечь от момента нанесения раствора на стекло!**

7. Поместить препараты на 5 минут в 1xPBS
8. Поместить препараты на 10 минут в 1% формальдегид на 1xPBS
9. Поместить препараты на 5 минут в 1xPBS.
10. Провести препараты по серии спиртов 50%, 70%, 96% по 3 минуты в каждом.
11. Высушить препараты на воздухе при комнатной температуре.
12. Поместить препараты на 1 час в термоблок при температуре 65°C.

Подготовка зонда:

1. Довести до комнатной температуры буфер для гибридизации и олигонуклеотидный зонд **ВНИМАНИЕ: осадить капли с крышки центрифугированием перед тем как открывать пробирки!**
 2. В стерильной микропробирке смешать 7 мкл буфера для гибридизации, 1 мкл зонда и 2 мкл стерильной воды (при необходимости можно использовать в комбинации с другими зондами).
 3. Тщательно перемешать на вортексе и отцентрифугировать.
- Подготовленные пробы могут храниться до полного использования при -20°C. В этом случае надо только разморозить пробу перед использованием.

Денатурация и гибридизация:

1. Нанести на выбранный участок препарата раствор зонда, накрыть покровным стеклом и заклеить резиновым клеем для предохранения от высыхания при денатурации.
2. Поместить препараты на 3 минуты в термоблок при температуре 82°C **ВНИМАНИЕ: время при заданной температуре надо выдержать точно, нельзя изменять как в большую, так и в меньшую сторону!**
3. Инкубировать в течение 16-72 часов при комнатной температуре во влажной камере. **ВНИМАНИЕ: пересыхание может привести к выпадению пробы в осадок – препарат нельзя будет отмыть и, как следствие, проанализировать.**

Отмывки:

1. Подготовить растворы: 2xSSC, 2xSSC / 0,1% Tween 20.
2. Удалить клей, налить на стекло 100мкл 2xSSC и удалить покровное стекло скользящим движением. **ВНИМАНИЕ: не поцарапать препарат стеклом или пинцетом!**
3. Поместить препарат на 20 секунд в 2x SSC / 0,1% Tween 20.
4. Поместить препарат на 20 секунд в 2xSSC.
5. Поместить препарат на 20 секунд в 2xSSC.
6. Окунуть на несколько секунд препарат в дистиллированную воду чтобы смыть соль.
7. Провести препараты по серии спиртов 50%, 70%, 96% по 1 минуте в каждом.
8. Высушить препараты на воздухе при комнатной температуре.
9. Нанести 10 мкл заключающей среды и накрыть покровным стеклом (24x24 мм, №1)
10. Проанализировать препараты под микроскопом.

Библиография

- Stepakov A., Galkina S., Bogomaz D., Gaginskaya E., Saifitdinova A. Modified Synthesis of 6-carboxyfluorescein (6-FAM): Application to Probe Labeling for Conventional Cytogenetics // British Journal of Applied Science & Technology, 2015, V.7 №4, P.423-428. DOI: 10.9734/BJAST/2015/15991
- А.Ф. Сайфитдинова. Современные методы цито-молекулярного анализа для исследования повреждений ДНК и хромосомных перестроек. 2015. VII международная научная школа для молодых ученых по экологической генетике «Генетическая токсикология», посвященная 150-летию открытий Г.И. Менделя
- Е.И.Кошель, А.Г.Дёмин, А.Ф.Сайфитдинова, С.А.Галкина, А.В.Радаев, Е.Р.Гагинская Идентификация основных CNV-районов генома человека // Сборник тезисов 2-й Международной научной конференции Научного парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину». 2015.
- Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. – 2-е изд. испр. и доп. /СПб: Свое издательство, 108 стр. 2011. ISBN 978-5-4386-0005-3.