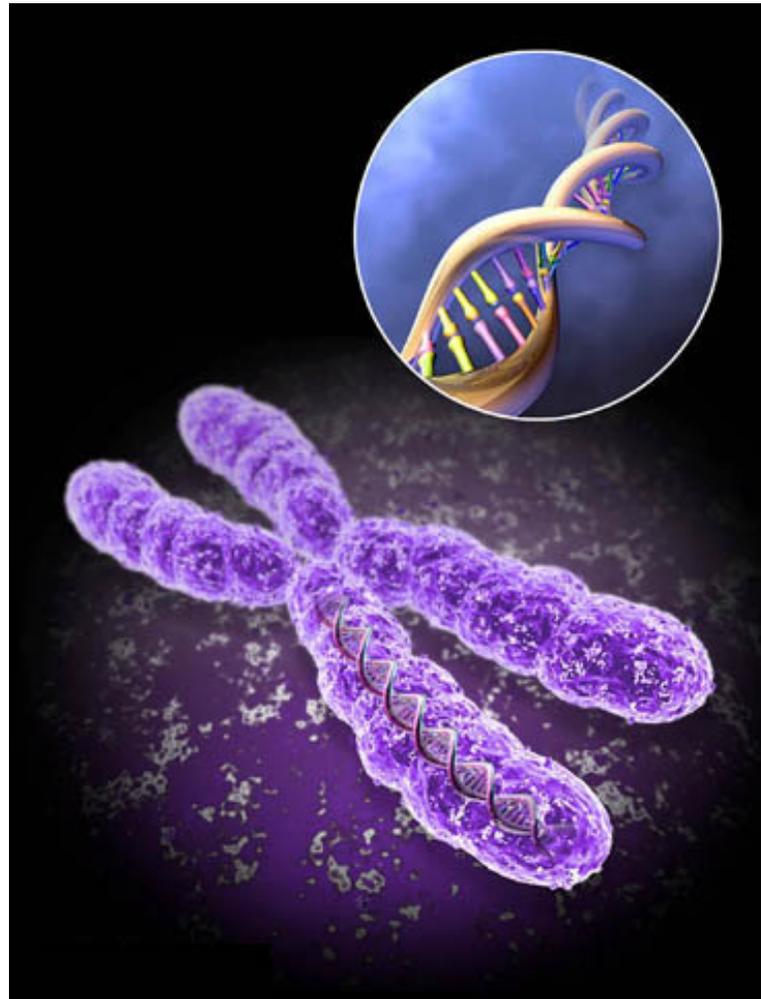




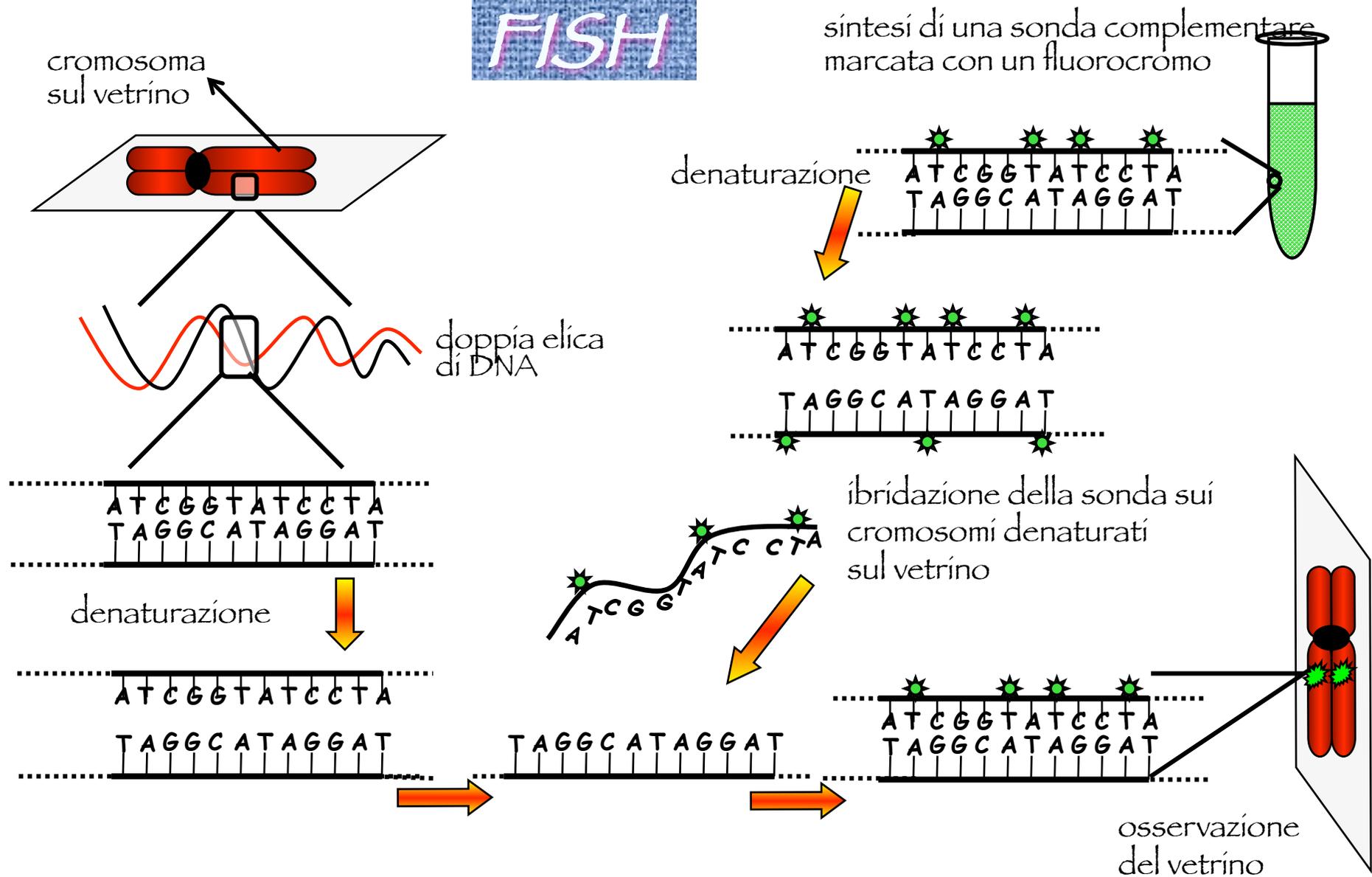
PROTOCOLLO FISH





Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana

FISH





Basi teoriche dell'ibridazione 1.

Due sono i fattori principali che influenzano l'associazione delle catene nucleotidiche nella reazione di ibridazione:

- **il grado di complementarietà** che regola l'appaiamento delle basi;
- **l'estensione fisica della complementarietà** che definisce la stabilità della struttura ibrida.



Basi teoriche dell'ibridazione 2.

La stabilità della struttura ibrida
viene espressa dalla funzione

$$D = 500/L$$

dove D indica il decremento
della temperatura di fusione
della doppia elica ibrida rispetto
a quella nativa e L indica
l'estensione delle sequenze
associate.



Basi teoriche dell'ibridazione 3.

Altri fattori che influenzano

l'associazione o, meglio la velocità di associazione sono:

- tempo necessario alla formazione della prima breve sequenza appaiata, fenomeno denominato **nucleazione**. La velocità di nucleazione è massima quando le sequenze *driver* (o sequenze del DNA nativo) e le sequenze *tracer* (o sequenze traccianti) sono della stessa lunghezza. Essa, invece, si riduce in particolar modo quando il tracer è più corto del driver.



Basi teoriche dell'ibridazione 4.

- **composizione in basi azotate** delle sequenze. Le coppie G-C conferiscono maggiore stabilità al DNA ibrido.
- **temperatura di ibridazione.** In condizioni standard questa è circa 25°C inferiore alla temperatura di fusione.
- **concentrazione dei sali** del mezzo in cui avviene l'ibridazione. La velocità di associazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di NaCl per valori compresi tra 0,1 e 1,2M.



ed adesso analizziamo passo dopo passo il protocollo...

PREPARAZIONE
DEL VETRINO



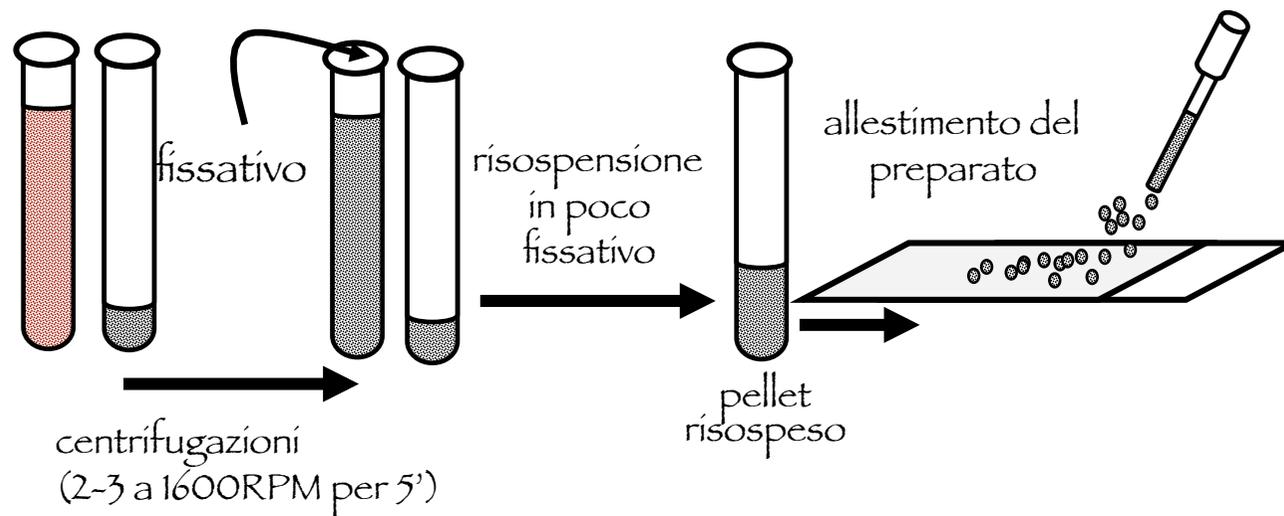
PREPARAZIONE
DELLA SONDA

PREPARAZIONE DEL VETRINO

- 1) STRISCIO DEL VETRINO DA UNA COLTURA DI CELLULE
- 2) INVECCHIAMENTO: 1h 30min a essiccare in stufa a 90°C
- 3) TRATTAMENTO con pepsina ed incubazione a 37°C in camera umida
- 4) LAVAGGI E DEIDRATAZIONE



1) STRISCIO DEI VETRINI





Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana



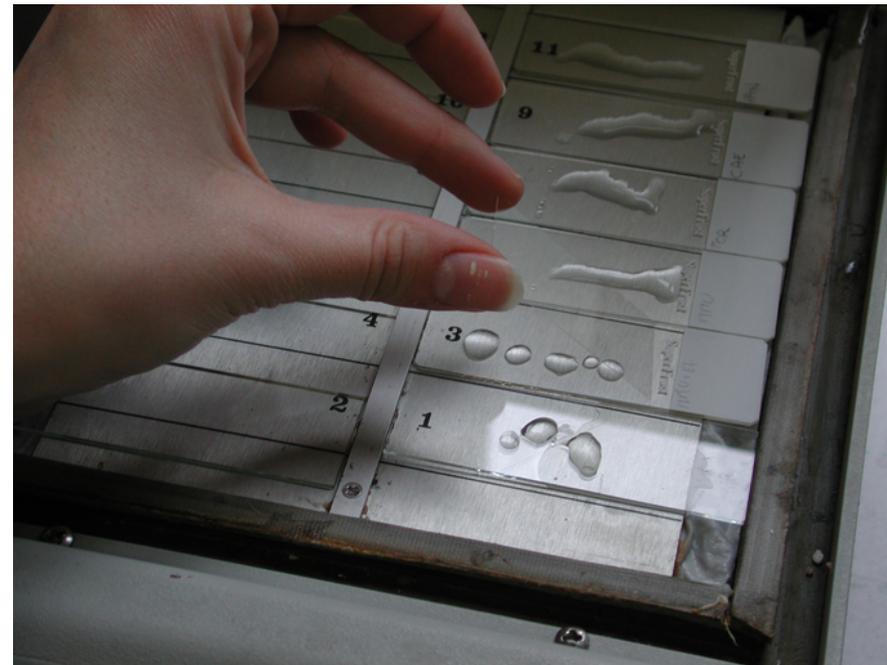


2) TRATTAMENTO CON PEPSINA-HCl



aggiungere i vetrini su apposite macchine
Vysis e aggiungere
150 μ l di P-HCl su ogni vetrino

Porre un vetrino copri-oggetto
24x50 sul vetrino e premere
leggermente per favorire la
diffusione della P-HCl.
Incubare a 37°C per 30 min.





3) TRATTAMENTO E DEIDRATAZIONE



Preparare le soluzioni:

1. PBS 1x (5ml PBS 10x+45ml ddH₂O)
2. MgCl₂ (5ml PBS10x+5ml MgCl₂ 0.5M+40ml ddH₂O)
3. PARAFORMALDEIDE (5ml PBS10x+5ml MgCl₂ 0.5M+25ml Paraf 8%+15ml ddH₂O)

SCALA DI ALCOOLI: 70%~90%~100%



Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana



Immergere i vetrini in ogni soluzione per 5min:

- 1) PBSIX
- 2) $MgCl_2$
- 3) PARAFORMALDEIDE
- 4) PBSIX
- 5) EtOH 70%
- 6) EtOH 90%
- 7) EtOH 100%

NB: Dopo il primo lavaggio in PBSIX la stessa soluzione viene riutilizzata dopo la Paraformaldeide

Lasciare i vetrini in EtOH 100% fino al momento dell'ibridazione





PREPARAZIONE DELLA SONDA

- 1) INOCULO DEL CLONE BAC IN TERRENO LIQUIDO LB E CRESCITA O.N. A 37°C
- 2) ESTRAZIONE DEL BAC
- 3) MARCATURA DELLA SONDA PER NICK TRANSLATION
- 4) PRECIPITAZIONE DEL DNA MARCATO
- 5) ELUIZIONE CON MIX DI IBRIDAZIONE
- 6) DENATURAZIONE E IBRIDAZIONE



1) INOCULO E CRESCITA O.N. IN INCUBATORE A 37°C

N.B.: LAVORARE IN CONDIZIONI STERILI (fiamma)



1. Preparare una falcon con 10ml di LB + 4ul di antibiotico (cloramfenicolo 50mg/ml)



2. Prelevare con un'ansa sterile i batteri dal clone conservato in terreno semisolido (LB+Agar a 4°C) o in Glicerolo (-80°C).



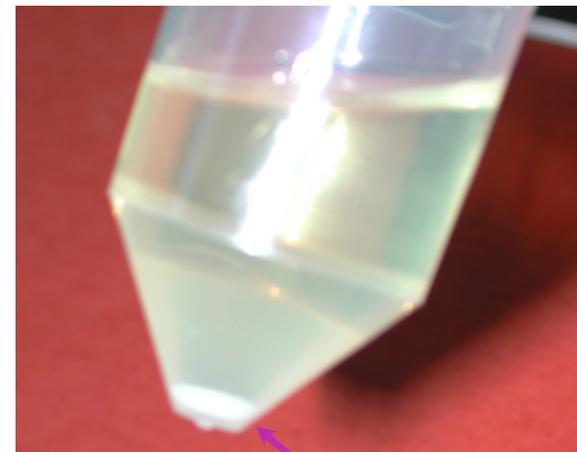
3. CRESCITA DEI BATTERI O.N. IN INCUBATORE A 37°C





2) ESTRAZIONE DEI BAC

1. centrifugare i batteri 10 min a 4000rpm



PELLET



Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana



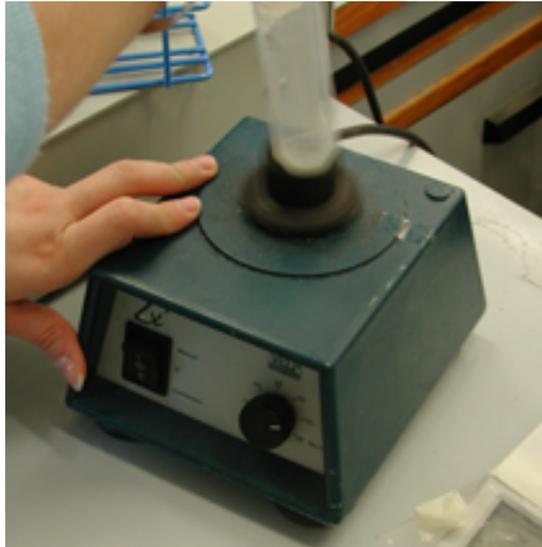
2.eliminare il sovrnatante



3.aggiungere 250 ul di resuspention solution



Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana



4. agitare sul vortex



5. preparare delle eppendorf da 2 ml col nome del bac



Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana



6. trasferire le cellule risospese nelle eppendorf da 2ml

7. aggiungere 250ul di soluzione di lisi, invertire 6 volte e attendere 2-3 minuti

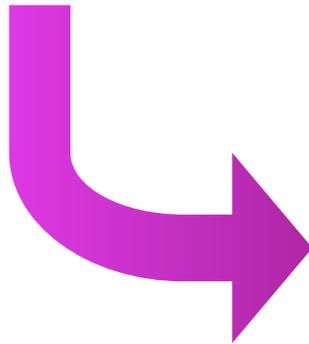




Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana



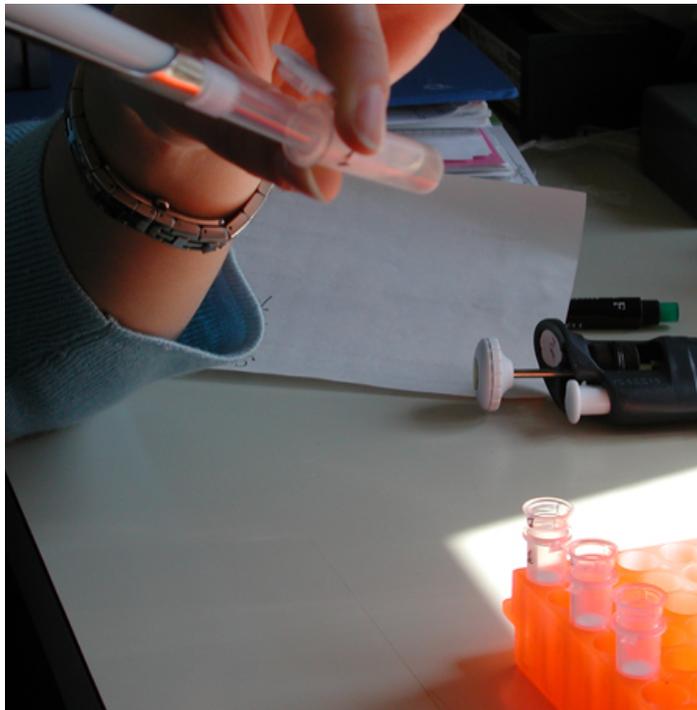
8. aggiungere 350ul di binding buffer,
invertire 6 volte e mettere
le provette in ghiaccio per 3-4 minuti
9. centrifugare a 13.000rpm per 10min





Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana

10. preparare delle nuove eppendorf da 2ml con apposito filtrino



11. trasferire il sovranatante nelle eppendorf col filtrino

12. Centrifugare per 1 minuto a 13000 rpm



13. Eliminare il filtrato e riporre il filtrino nella stessa eppendorf



NB: IL DNA E' NEL FILTRINO

14. Aggiungere nel filtrino 500ul di Wash Buffer I +EtOH, centrifugare 1min a 13.000rpm, eliminare il filtrato e riporre il filtrino nella stessa eppendorf



15. Aggiungere nel filtrino 700ul di Wash Buffer II +EtOH, centrifugare 1min a 13.000rpm ed eliminare il filtrato



16. Centrifugare 1min a 13.000rpm trasferire il filtrino in una nuova eppendorf da 1,5ml con il nome del bac e aggiungere 80ul di ddH₂O

17. attendere qualche min e centrifugare 1min a 13.000rpm quindi buttare il filtrino.
NB: IL DNA E' NEL FILTRATO

18. controllare la concentrazione del DNA su gel d'agarosio 1% usando come marker il DNA del fago lambda tagliato con l'enzima Hind III

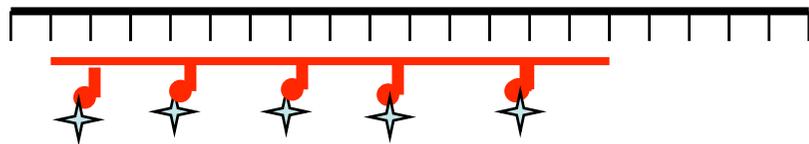




MARCATURA

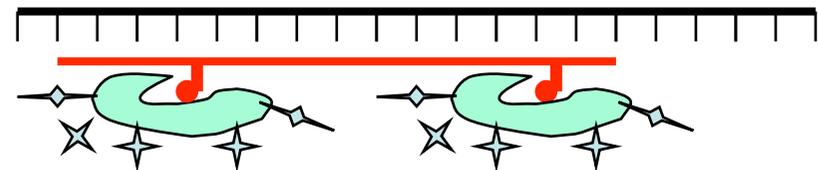
Marcatura diretta

per incorporazione di un nucleotide modificato (dUTP) **direttamente legato ad un fluoroforo** (un gruppo chimico che emette fluorescenza quando eccitato da luce a specifiche lunghezze d'onda) come **AMCA; DEAC; CB; FITC; OG; A48; RGr; R6G; TAMRA; TxR; Cy3; Cy3.5; Cy5, Cy5.5**



Marcatura indiretta

per incorporazione di un nucleotide modificato (dUTP) contenente un gruppo **reporter** come biotina (**BIO**) o digossigenina (**DIG**) capaci di legare per affinita' apteni legati a molecole fluorescenti (streptavidina, anticorpi anti-dig)

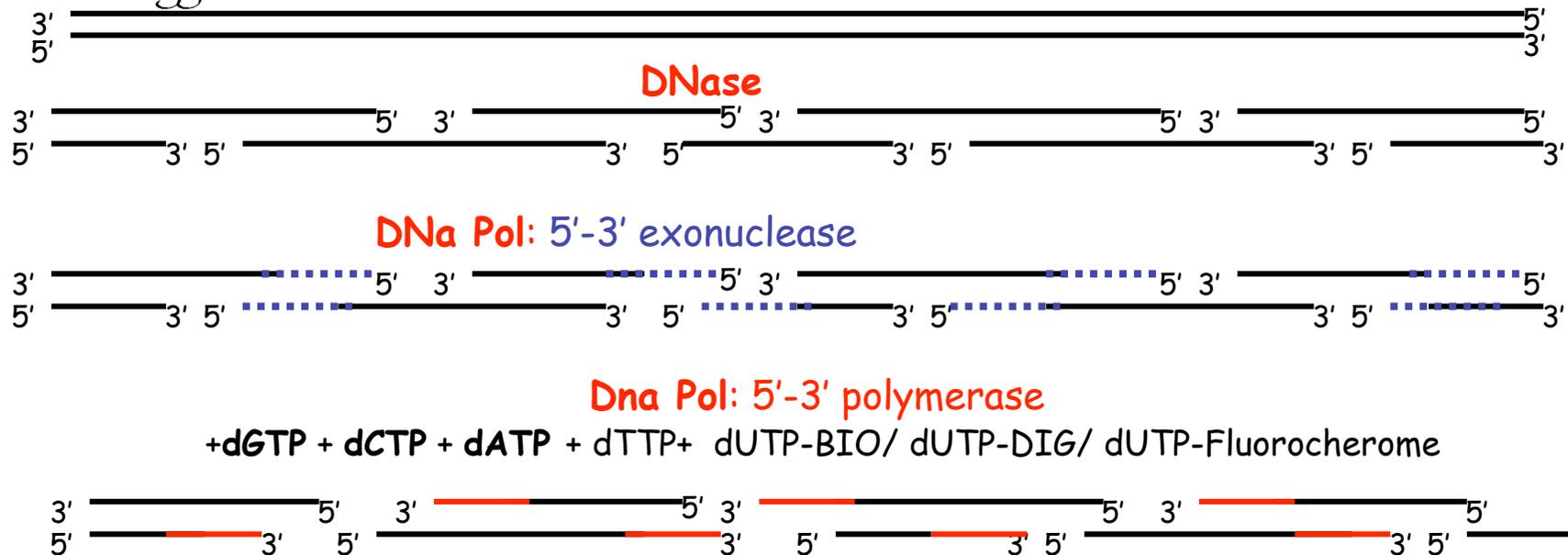




Nick translation

Si basa sull'attività di due enzimi: la DNase pancreatica e la DNA polimerasi I di E. coli che agiscono come nelle reazioni di riparo dei danni al DNA causati da raggi UV:

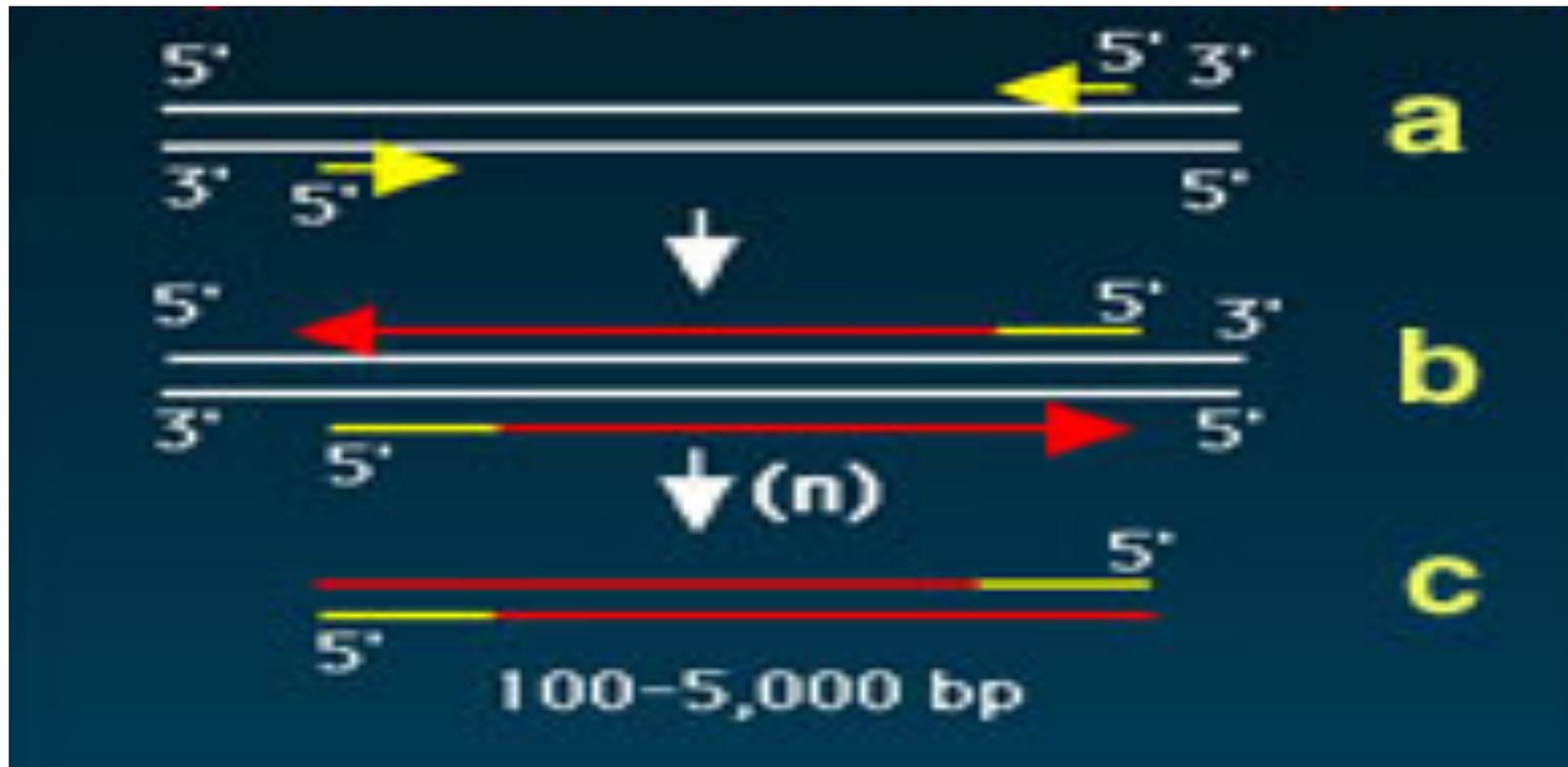
- **DNase I** (endonucleasi) produce "nicks" tra basi adiacenti su entrambi i filamenti di DNA in maniera casuale.
- **DNA Pol I** ha attività esonucleasica e polimerasica, quindi digerisce nucleotidi a livello del taglio in direzione 5'-3' e quindi lega il 3'OH libero e con l'attività polimerasica riempie i nick con i nucleotidi aggiunti di cui uno marcato.





PCR

Sfrutta l'attività della Taq polimerasi che in presenza di opportuni primers incorpora nucleotidi (di cui uno marcato) per l'intera sequenza di DNA compresa tra i due primers.





3) MARCATURA DELLA SONDA PER NICK TRANSLATION

LA MARCATURA SI PUO FARE IN MODO DIRETTO O INDIRETTO

Marchiamo 1 μ (1000ng) di DNA:

$$[\text{DNA}] = 50 \text{ ng/ul} \quad \longrightarrow \quad V_{\text{DNA}} = 1000 \text{ ng}/50\text{ng/ul}$$

$$V_{\text{DNA}} = 20 \text{ ul}$$

$$V_{\text{MIX}} = 22 \text{ ul}$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = 8 \text{ ul}$$

$$V_f = 50 \text{ ul}$$

ANALIZZIAMO
I REAGENTI...



Marcatura diretta con Cy3:

Mix di marcatura per 1 γ di DNA:

5ul Buffer 10X

5ul β -Mercaptoetanololo (0,1M)

1ul dACG (0,5mM)

0,5ul dUTP/Cy3 (1mM)

0,5ul DNAPolimerasi I (5U/ul)

10ul DNasi I (diluizione 1/1000 della DNasi 2U/ul)

22 ul

Se stiamo marcando piu' di 1 bac
bisogna moltiplicare il volume di
ogni reagente per il numero dei
campioni



Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana

1. preparare delle eppendorf da 1,5ml col nome del bac da marcare



2. aggiungere ddH₂O e DNA in ogni eppendorf da 1,5ml



3. PREPARARE LA MIX DI MARCATURA in una eppendorf da 1,5ml utilizzando i reagenti della Nick Translation:

5ul Buffer 10X

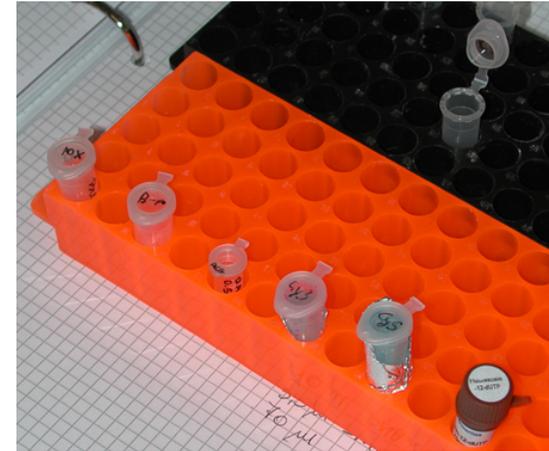
5ul β -Mercaptoetanololo (0,1M)

1ul dACG (0,5mM)

0,5ul dUTP/Cy3 (1mM)

0,5ul DNAPolimerasi I (5U/ul)

10ul DNasi I (diluizione 1/1000 della DNasi 2U/ul)



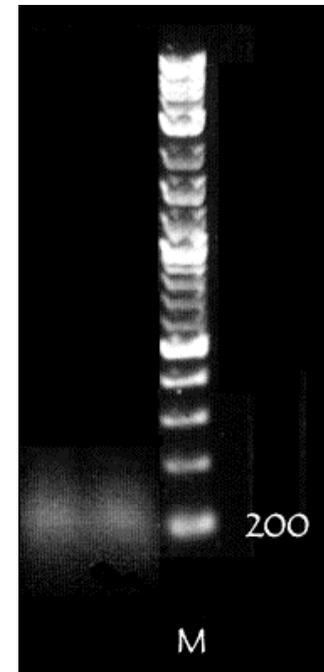
NB: preparare la diluizione 1/1000 della DNasi



4. aliquotare 22ul di mix in ogni eppendorf contenente il bac da marcare



7. controllare la marcatura del DNA sul gel d'agarosio 1% usando un marker a bassi pesi molecolari.



5. incubare 2 ore a 15°C

6. bloccare la reazione in ghiaccio



4) PRECIPITAZIONE DELLA SONDA

SI SEPARA LA SONDA DALLA MIX DI MARCATURA

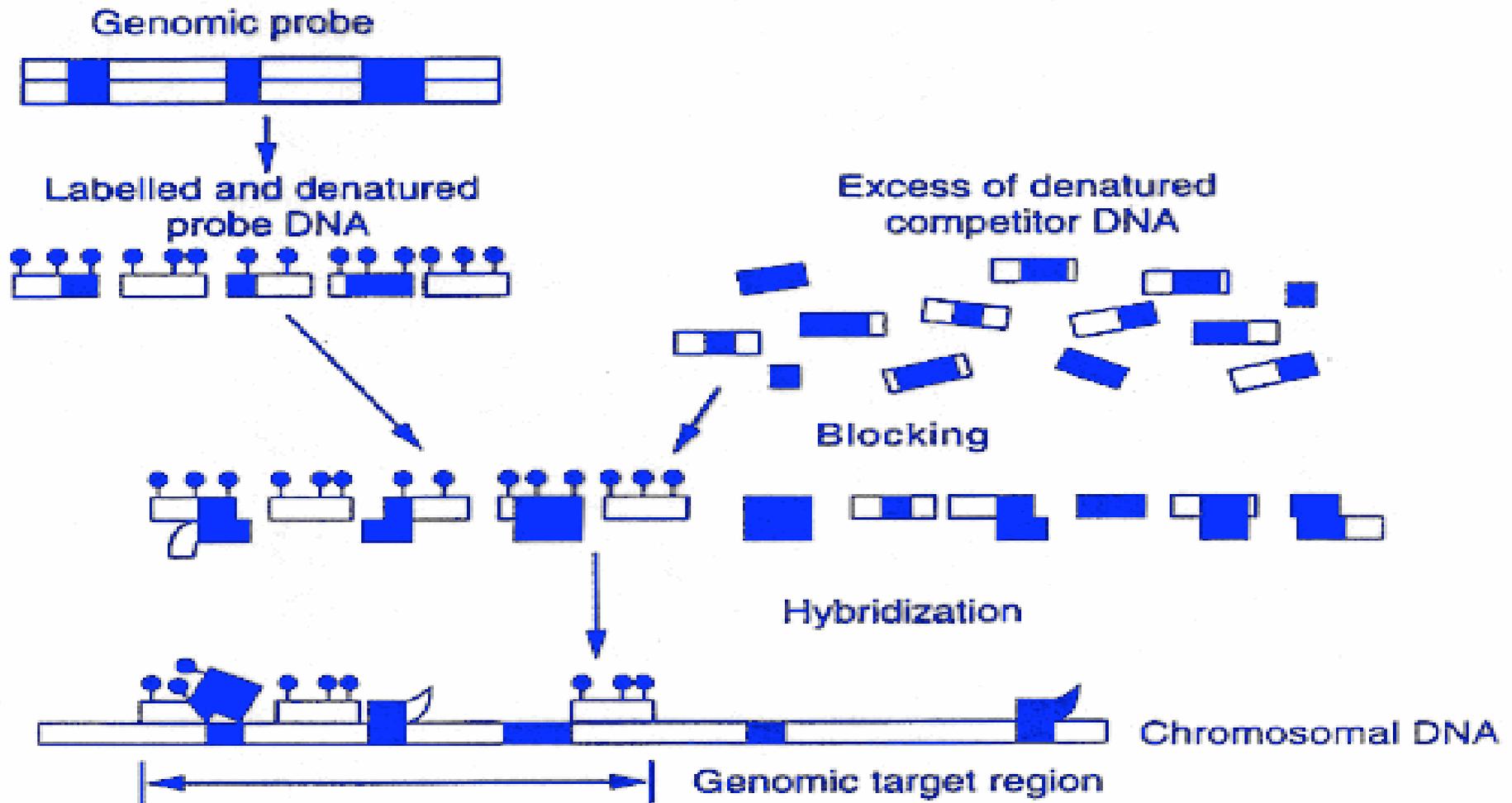
*OPERIAMO UNA PRECIPITAZIONE ALCOLICA
A SCAMBIO IONICO*

Reagenti:

DNA marcato	Cot-I (1mg/ml)	SSD (1ug/ul)	NaAc (3M)	EtOH (100%)
50ul	5ul	5ul/vetrino	1/10 di DNA totale	3 volumi



Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana





1. Aggiungere tutti i reagenti alla sonda marcata
2. Agitare manualmente la provetta per mescolare tutti i reagenti
3. Porre la provetta per almeno 15min a -80°C o per almeno 30min a -20°C
(la bassa temperatura facilita la precipitazione del DNA)
4. Centrifugare 10min a 13.000 rpm
5. Aspirare il sovranatante con una siringa facendo attenzione a non toccare il pellet
6. Asciugare il pellet in Savant o in stufa



5) ELUIZIONE CON MIX DI IBRIDAZIONE

La sonda viene risospesa in MIX FISH (2XSSC, formammide deionizzata, dextran solfato)

N.B.: La formammide permette di abbassare la temperatura di denaturazione del DNA da 90-95°C a circa 70°C

1. aggiungere 15ul di Mix FISH nella provetta contenente la sonda precipitata
2. risospendere sul vortex



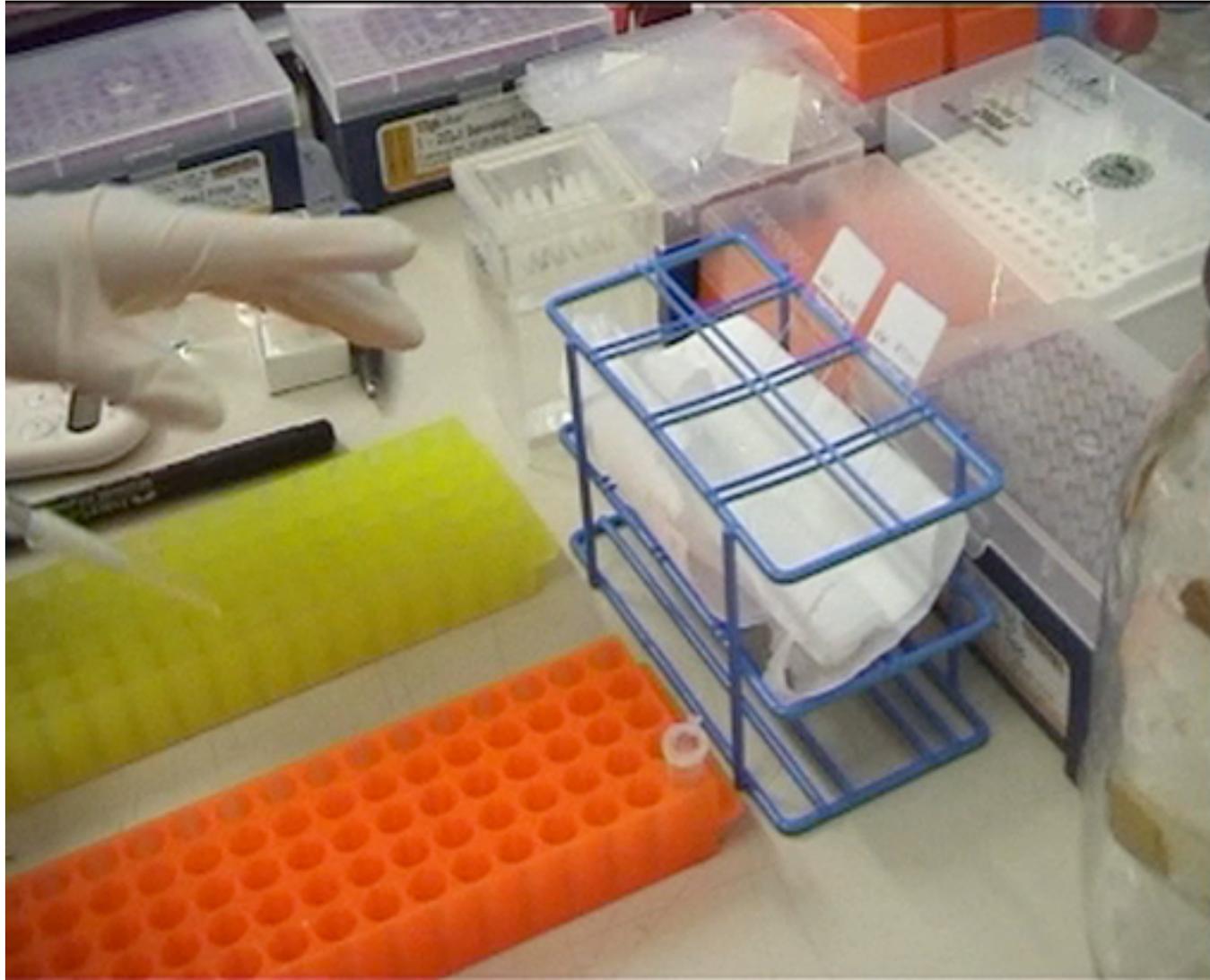
6) IBRIDAZIONE OVER NIGHT (O.N.)

L'ibridazione viene realizzata su apposite macchine (vysis) che permettono la denaturazione della sonda e dei cromosomi e la loro ibridazione.

1. aggiungere la sonda risospesa in Mix FISH sul vetrino
2. porre un copri-oggetto 24x50 sul vetrino ed eliminare con un puntale eventuali bolle d'aria
3. sigillare il vetrino con la rubber cement
4. adagiare il vetrino nella vyses e far partire il programma di denaturazione-ibridazione (per DNA con altissima similarita' di sequenza: 68°C per 2 min - 37°C O.N.)



Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana





7) LAVAGGI DEI VETRINI

...Il giorno dopo si effettuano i lavaggi dei vetrini. Si possono utilizzare due tipi di stringenza a seconda del grado di similarità tra le sequenze ibridate (sonda/cromosomi):

ALTA STRINGENZA

- 3 lavaggi in una soluzione 0,1xSSC (750ul 20xSSC + 150ml ddH₂O) a 60°C

BASSA STRINGENZA

- 3 lavaggi in una soluzione 50%formammide/2xSSC (75ml formammide + 15ml 20xSSC + 60ml ddH₂O) a 37°C
- 3 lavaggi in una soluzione 2xSSC (15ml 20xSSC + 135ml ddH₂O) a 42°C



Per sonde umane ibridate su metafasi umane si preferiscono condizioni di alta stringenza:

1. Preparare la soluzione 0,1xSSC
2. Riscaldare la soluzione a 60°C
3. Lavare i vetrini 5 minuti per 3 volte in coplin jar con 0,1xSSC

8) COLORAZIONE DEI CROMOSOMI

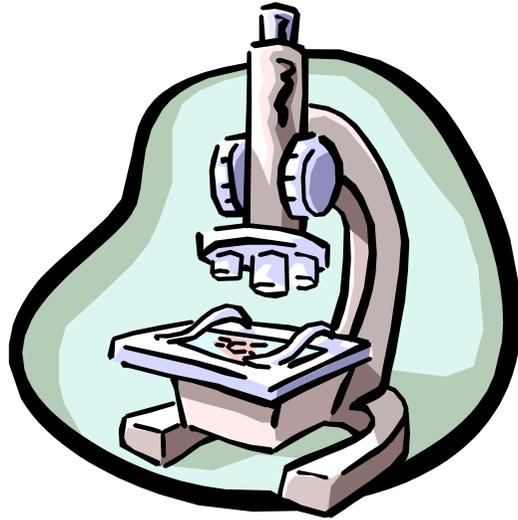
1. Colorare i vetrini in DAPI per 5 minuti
2. Montare i vetrini con ANTIFADE (1-2 gocce)
3. Porre un copri-oggetto 24x50 sul vetrino
4. Eliminare l'ANTIFADE in eccesso con della carta assorbente
5. Eliminare con un puntale eventuali bolle d'aria presenti sul vetrino



Terapia Genica e Laboratorio di Citogenetica Umana



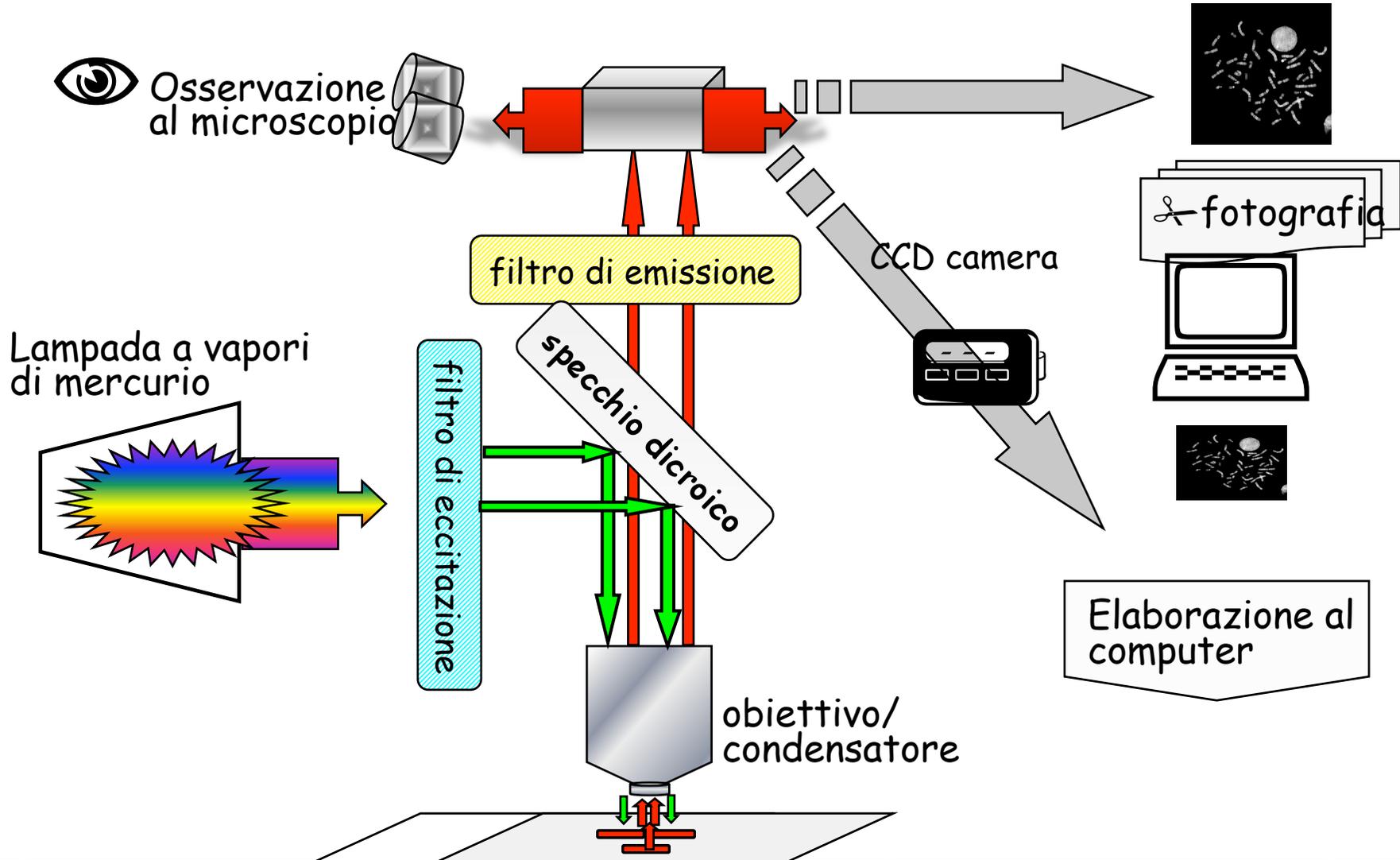
Dott. M. Ventura- Dott.ssa M. F. Cardone



I vetrini sono pronti per la visione al
microscopio a fluorescenza...

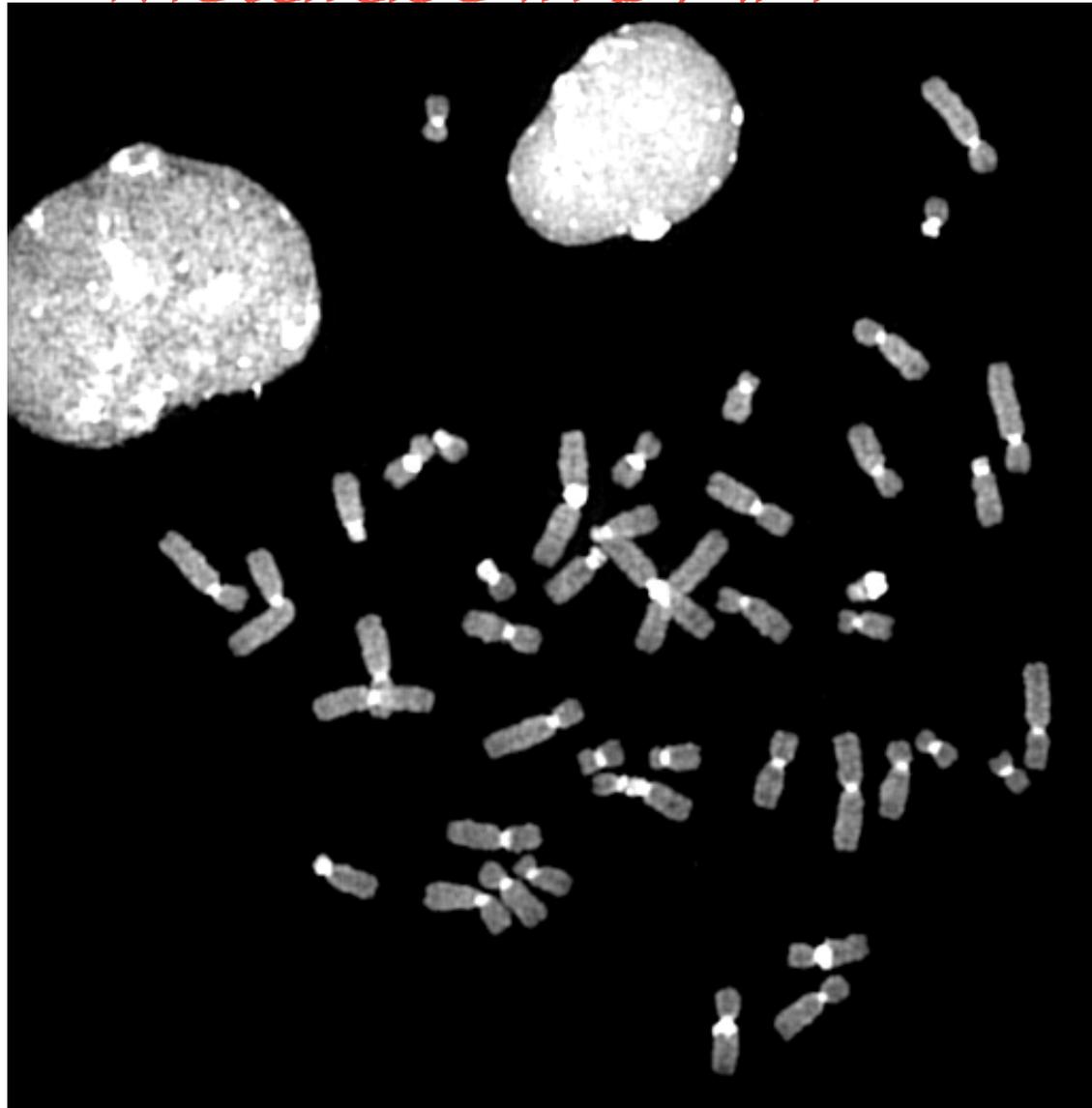


Microscopio a fluorescenza



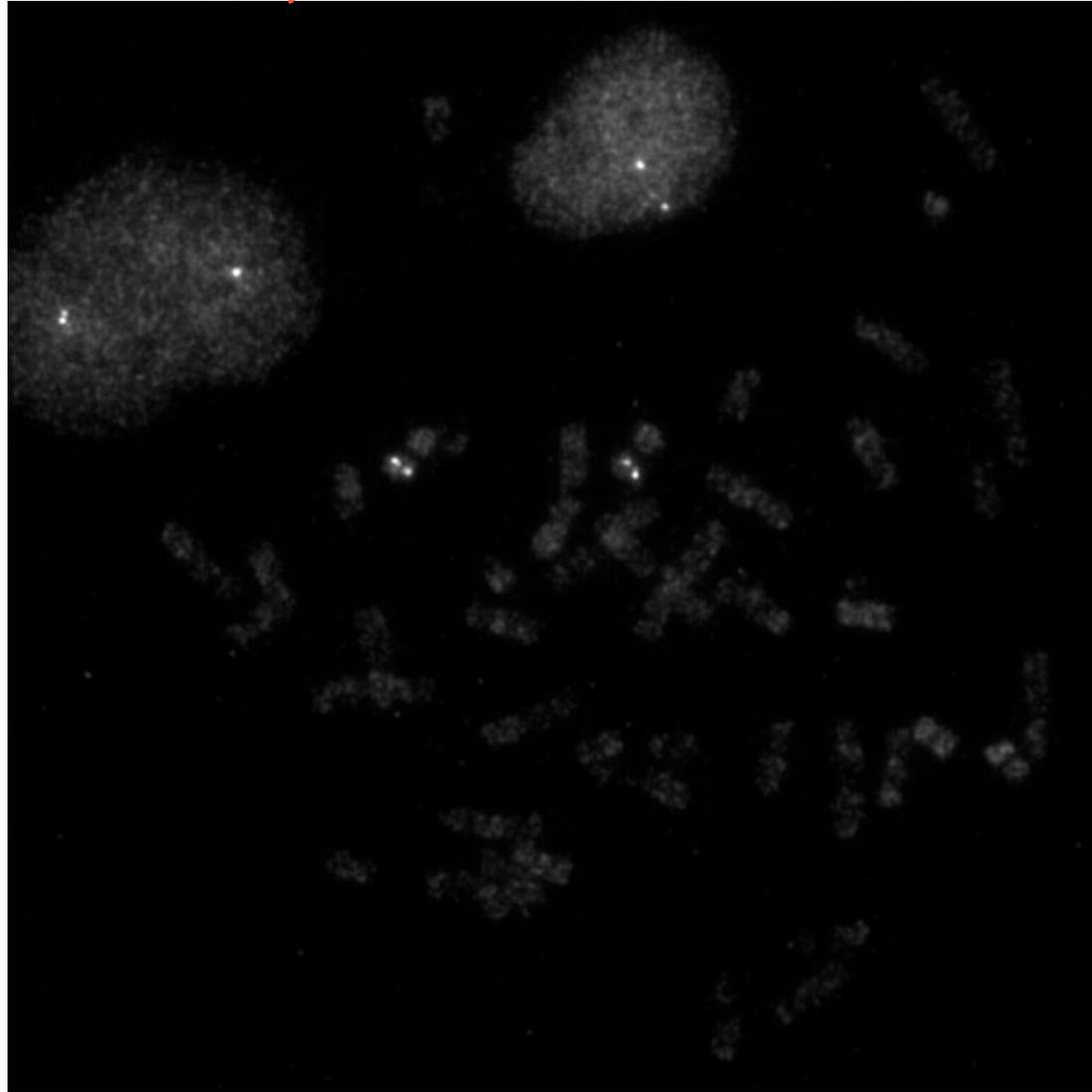


Metafase in DAPI





Sonde puntiformi fluorescenti





Merge

Sovrapposizione dell'immagine della sonda sull'immagine del DAPI

