

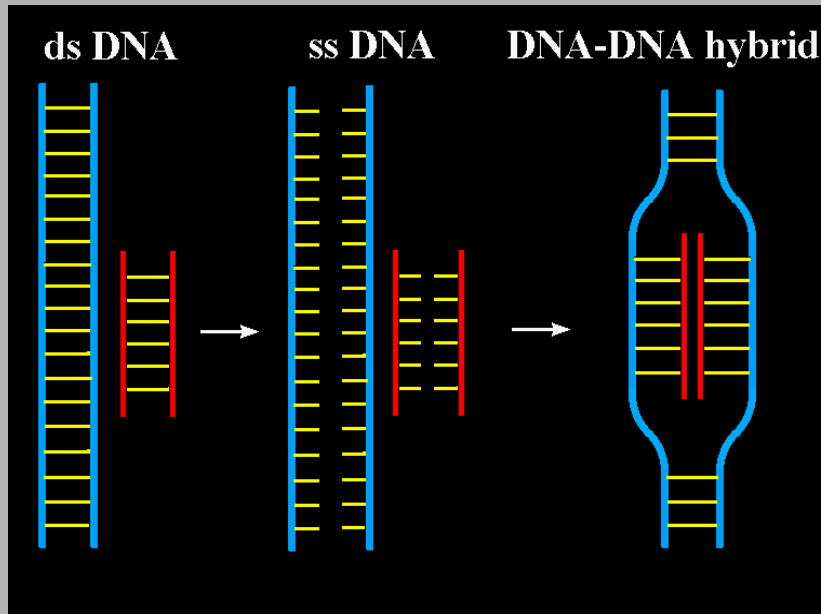
Fluorescenční *in situ* hybridizace - postup

Materiál

→ v naší laboratoři se zpracovává:

- kultivovaná kostní dřeň
- kultivovaná periferní krev
- kultivovaná plodová voda
- nekultivované amniocyty
- otisky kostní dřeně a tumoru

Denaturace a renaturace



zhotovení kvalitního preparátu obsahující cílové místo (metafázní chromozómy, interfázní jádra, tkáňové preparáty, celé buňky)

.příprava a značení sond

.denaturace sondy

.denaturace cílového místa

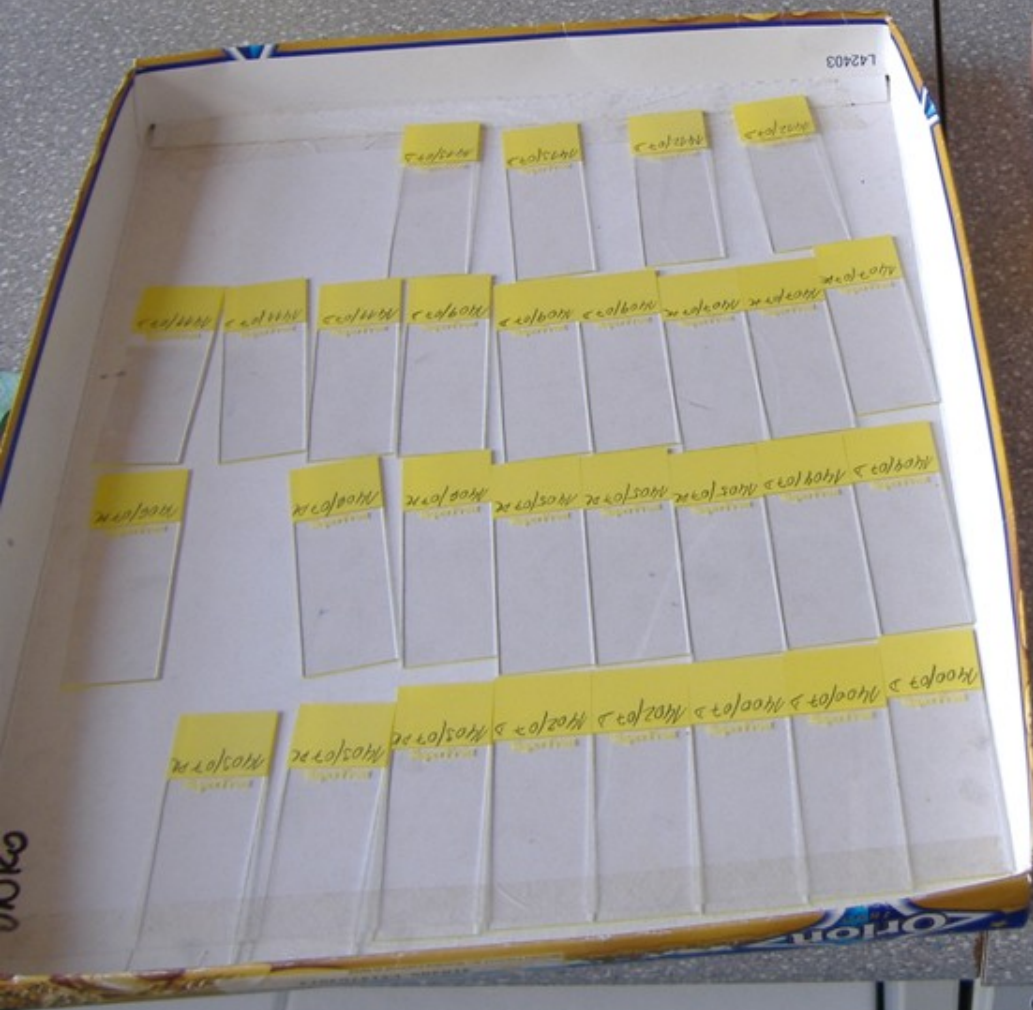
.hybridizační reakce mezi sondou a cílovým místem

.odstranění nenavázané či nespecificky vázané sondy

....barvení pozadí

.....vyhodnocení a zpracování fluorescenčního signálu

nakapaná sklíčka – suspenze jader po kultivaci

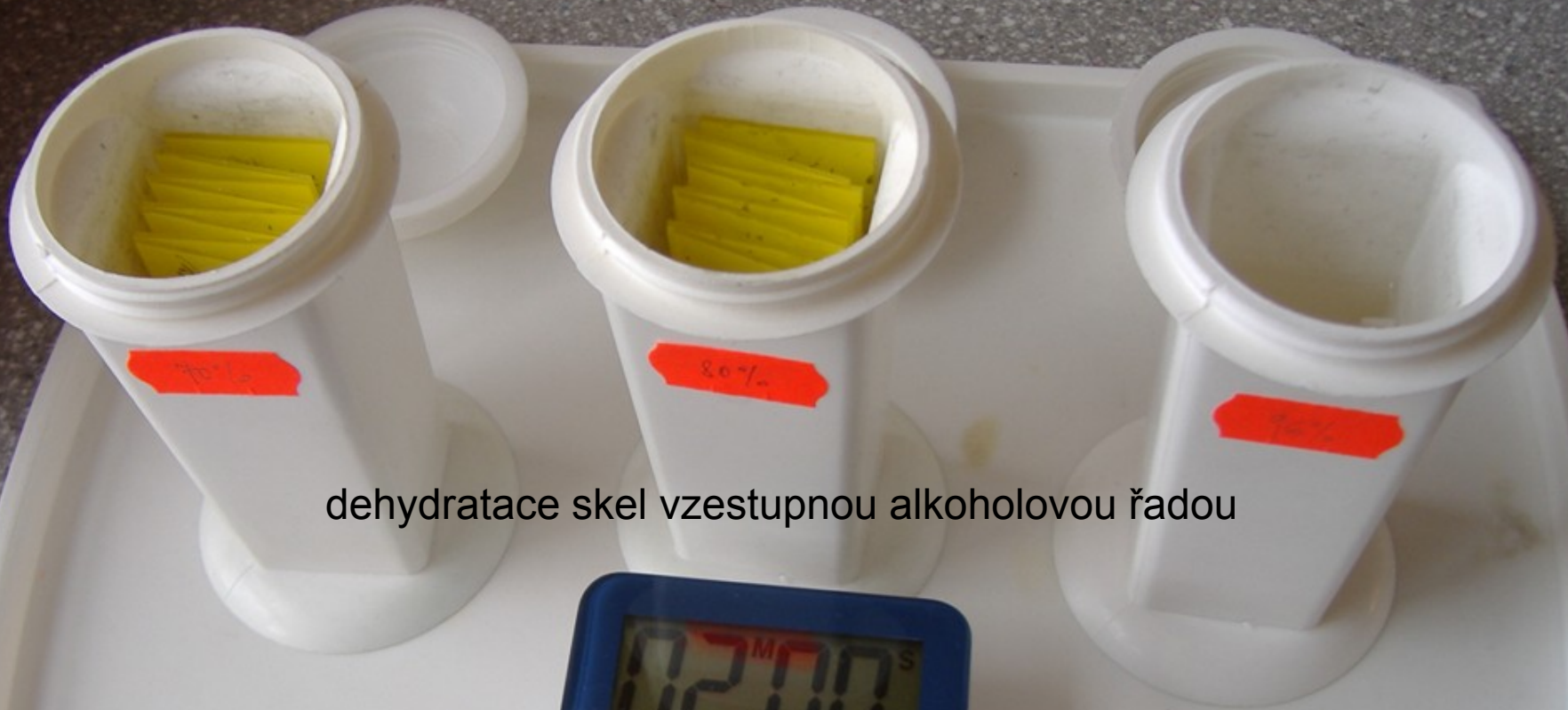


SKIA

zestaršení preparátů
v roztoku 2xSSC při
37°C



dehydratace skel vzestupnou alkoholovou řadou



sušení zestaršených skel pod větráčkem



komerčně dodávané sondy



sklo s nakapanou suspenzí

sonda



sklo s nakapanou suspenzí + sonda dohromady





orámování preparátu chemoprénem

Mini-16²

1327/07 X

SuperFrost



denaturace DNA a sondy
teplota závisí na typu sondy (75 C)
(přítomný formamid snižuje teplotu denaturace)

-105

amps / volts

MOS.cz
chemos.cz

30 20 10 0 80 90 100

STORVYONIC
76.6 °C
SET

50 40 30

01:00^S

COUNT DOWN / UP TIMER

MIN

SEC

START/STOP

CLEAR

MEMORY

vložení skel do vlhké komůrky

- v termostatu pak probíhá sekvenčně specifická hybridizace



nive
incubator

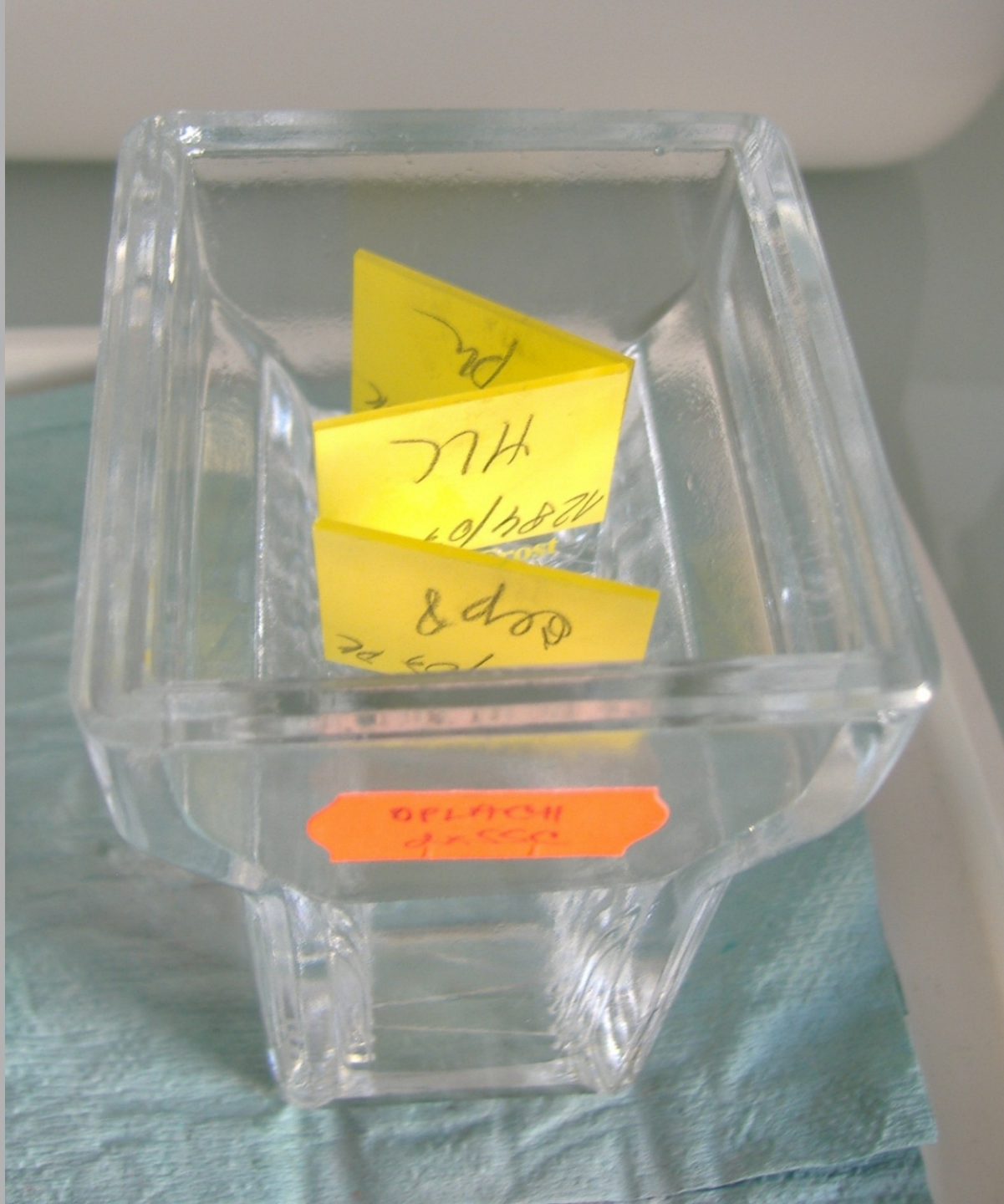


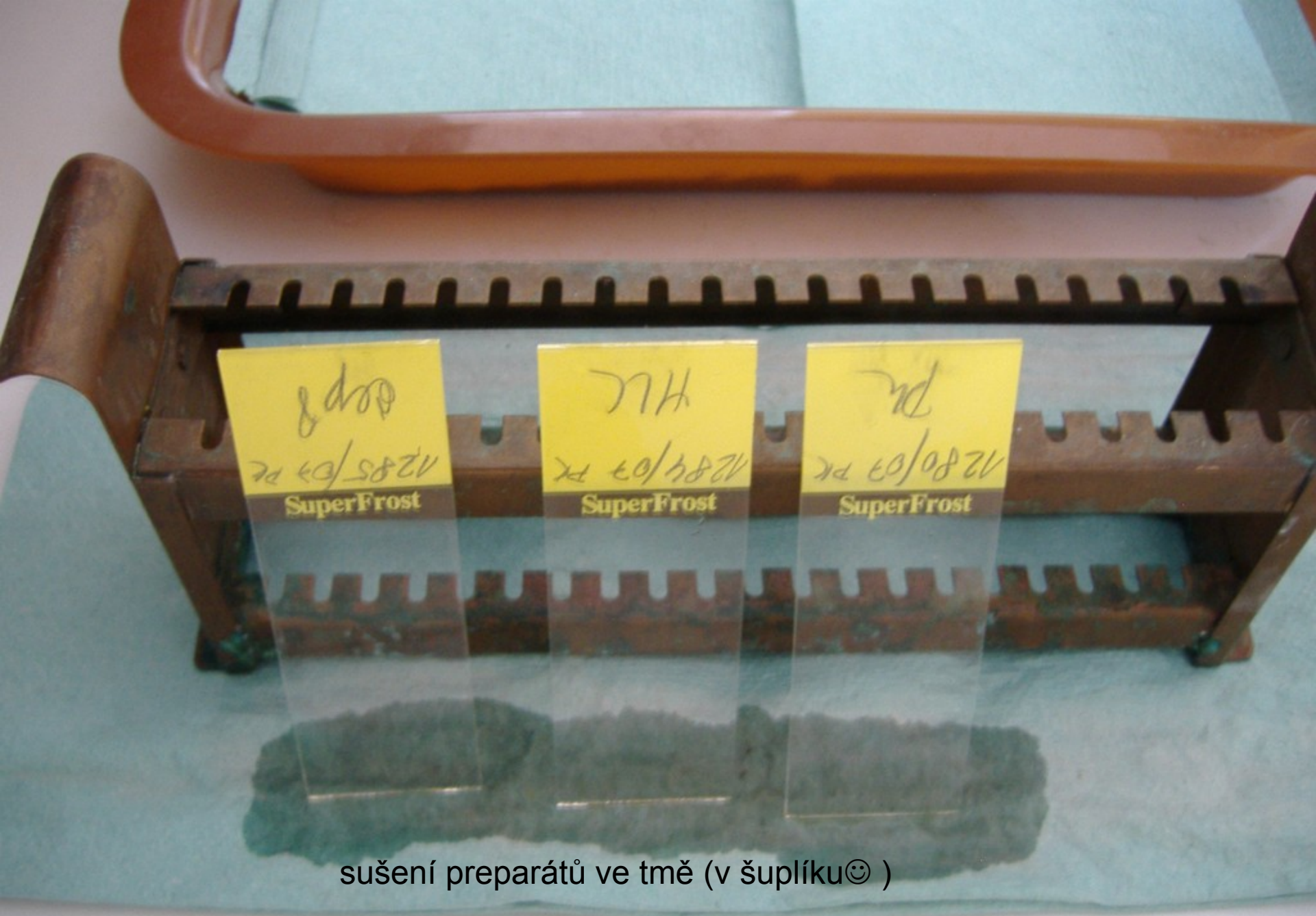
inkubace skel přes noc (1-2 dny) při 37°C

odmytí preparátů v 0,5xSSC - 4 min při 73°C

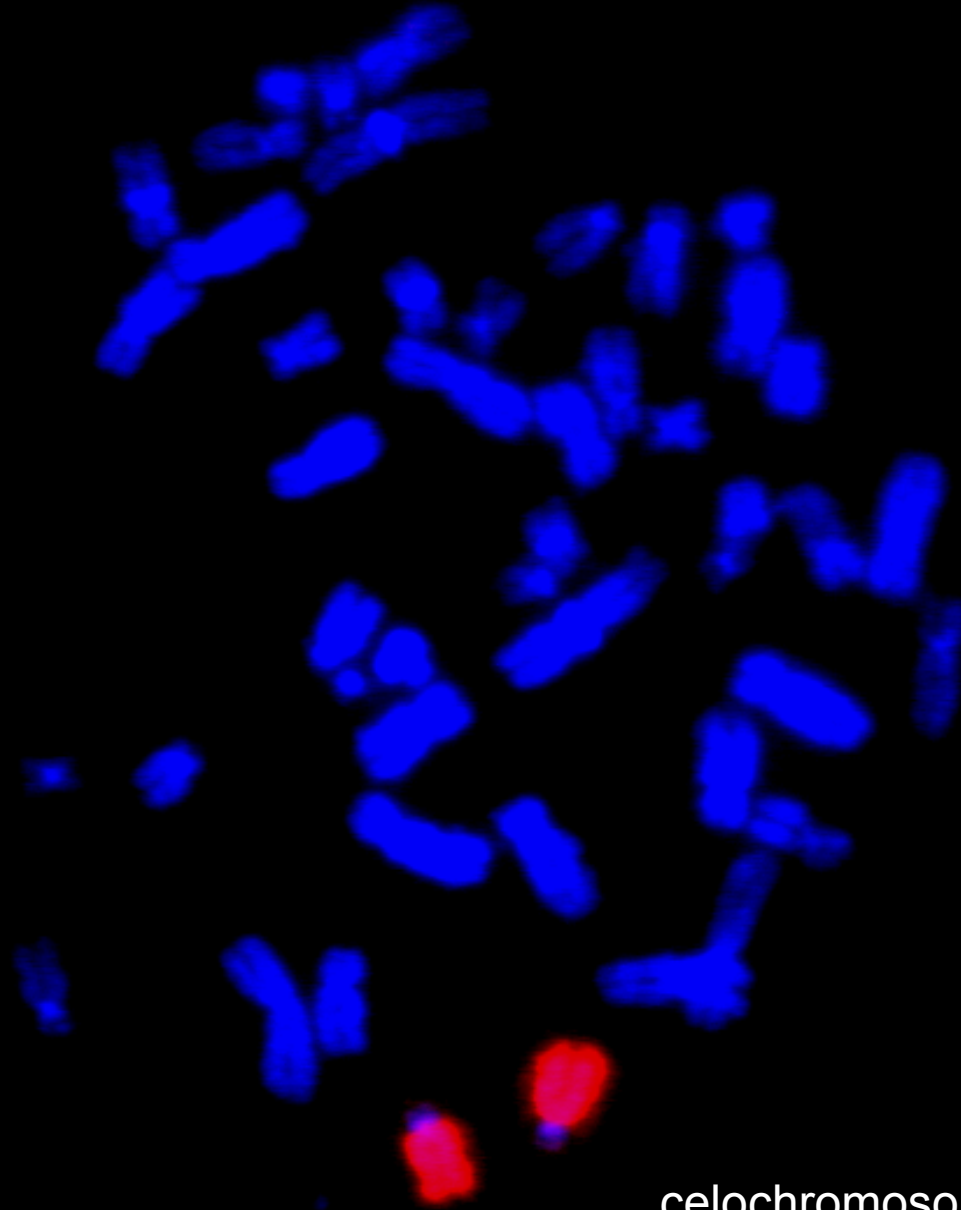


oplach preparátů v 2xSSC

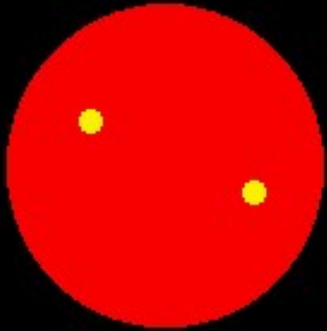




sušení preparátů ve tmě (v šuplíku☺)



celochromosomové sondy



Lokus specifické sondy

