

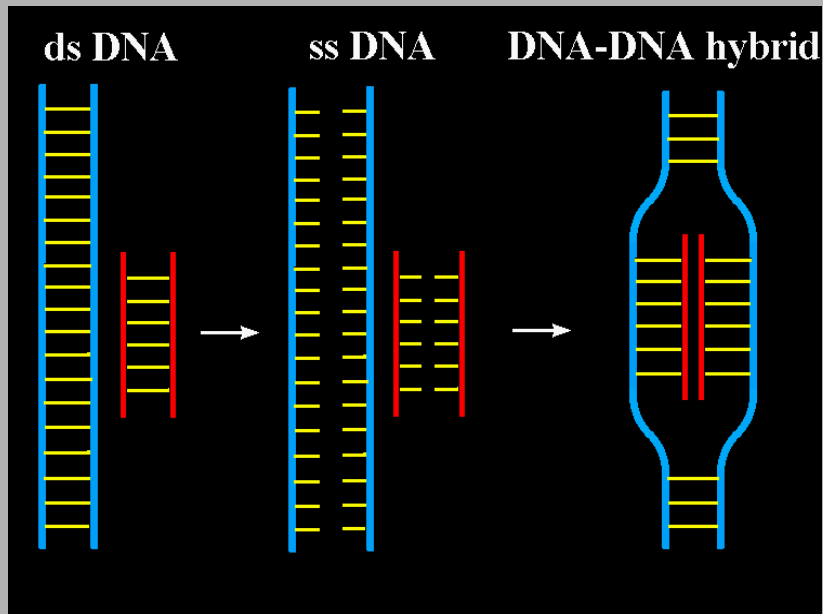
Fluorescenční *in situ*
hybridizace - postup

Materiál

→ v naší laboratoři se zpracovává:

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

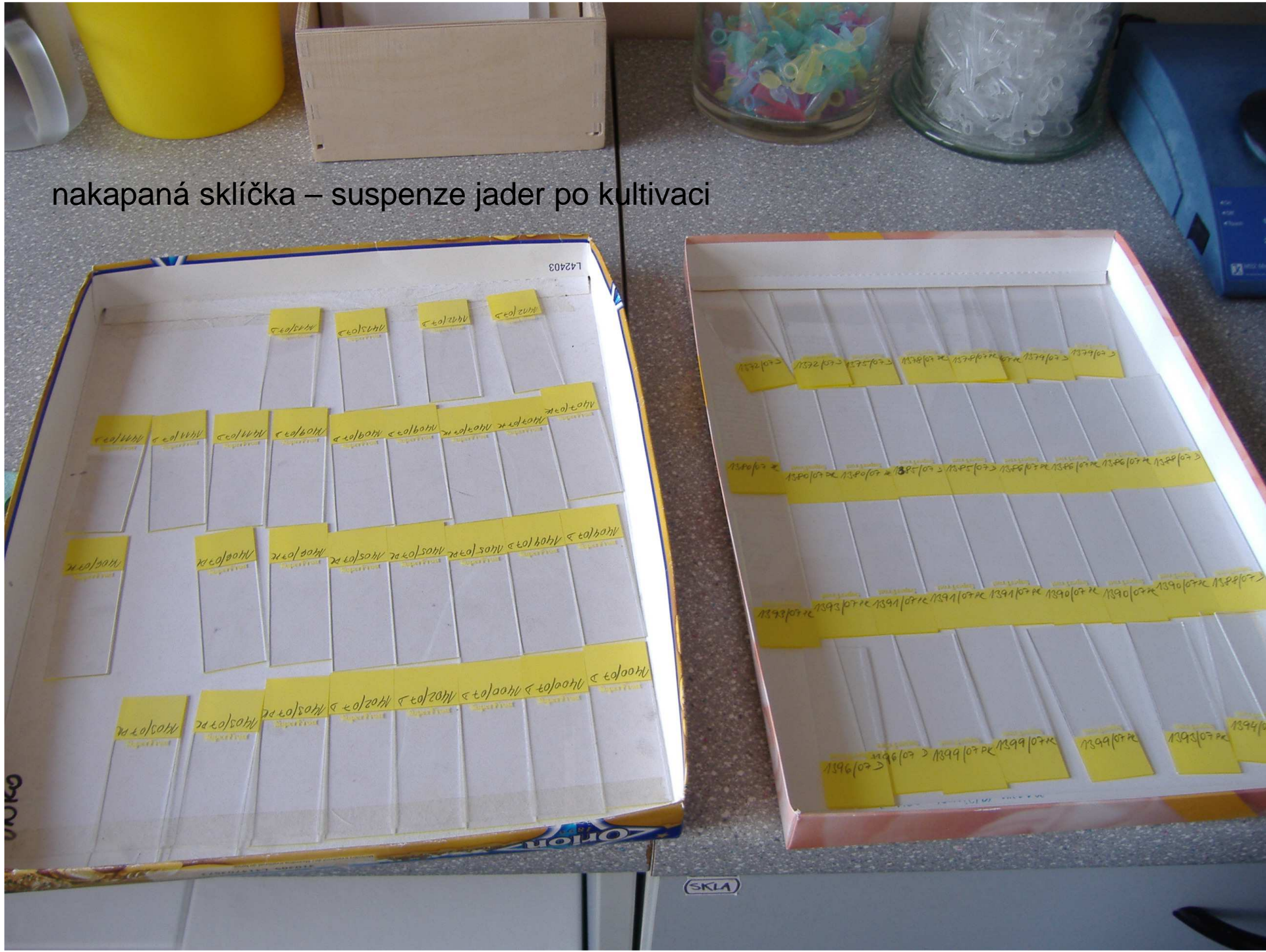
Denaturace a renaturace



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



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

1829/07 2
MM-16
SuperFrost



sklo s nakapanou suspenzí + sonda dohromady





orámování preparátu chemoprénem

Amir-16²

1827/07 3

SuperFrost

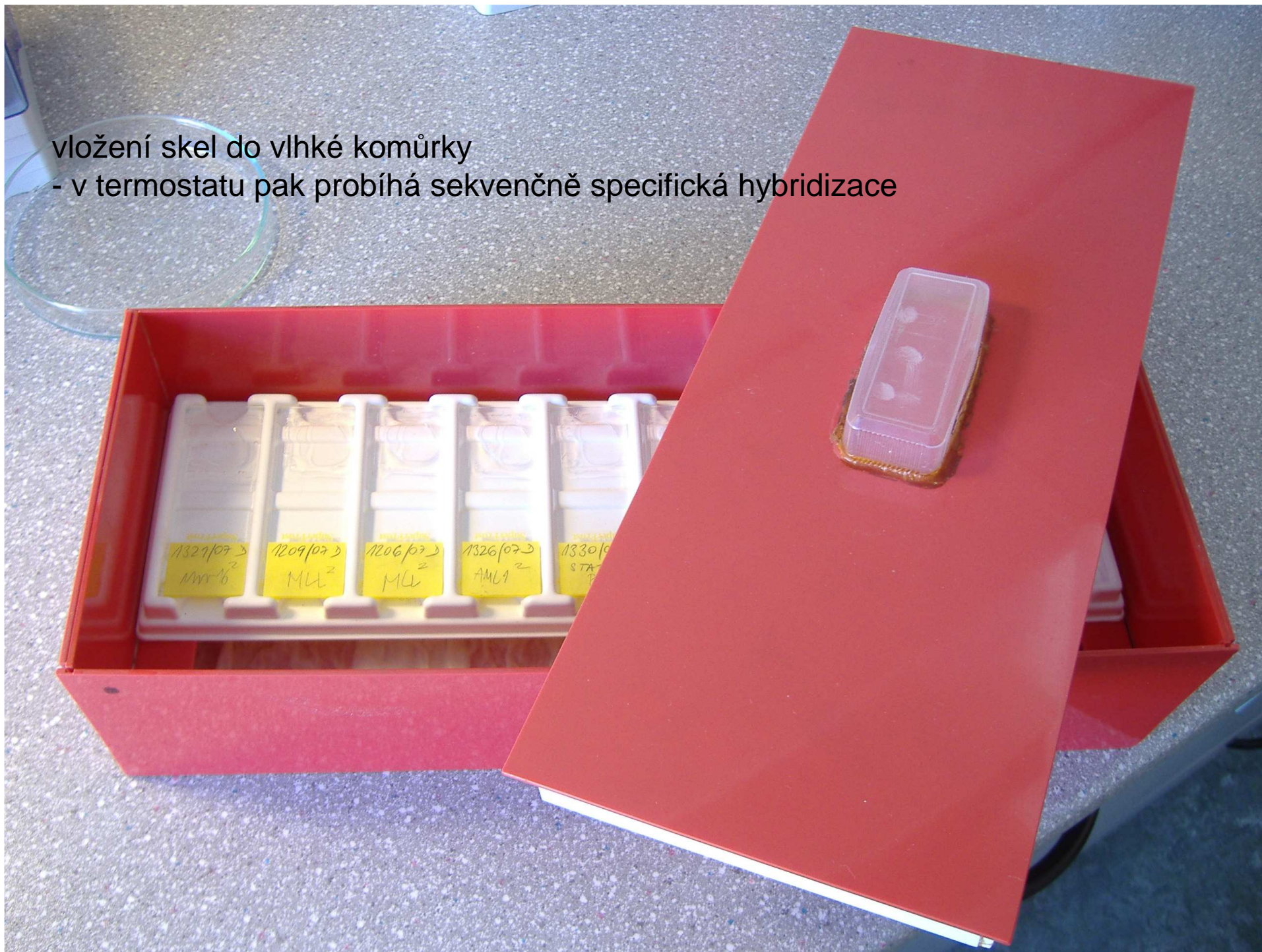


denaturace DNA a sondy
teplota závisí na typu sondy (75°C)
(přítomný formamid snižuje teplotu denaturace)



vložení skel do vlhké komůrky

- v termostatu pak probíhá sekvenčně specifická hybridizace



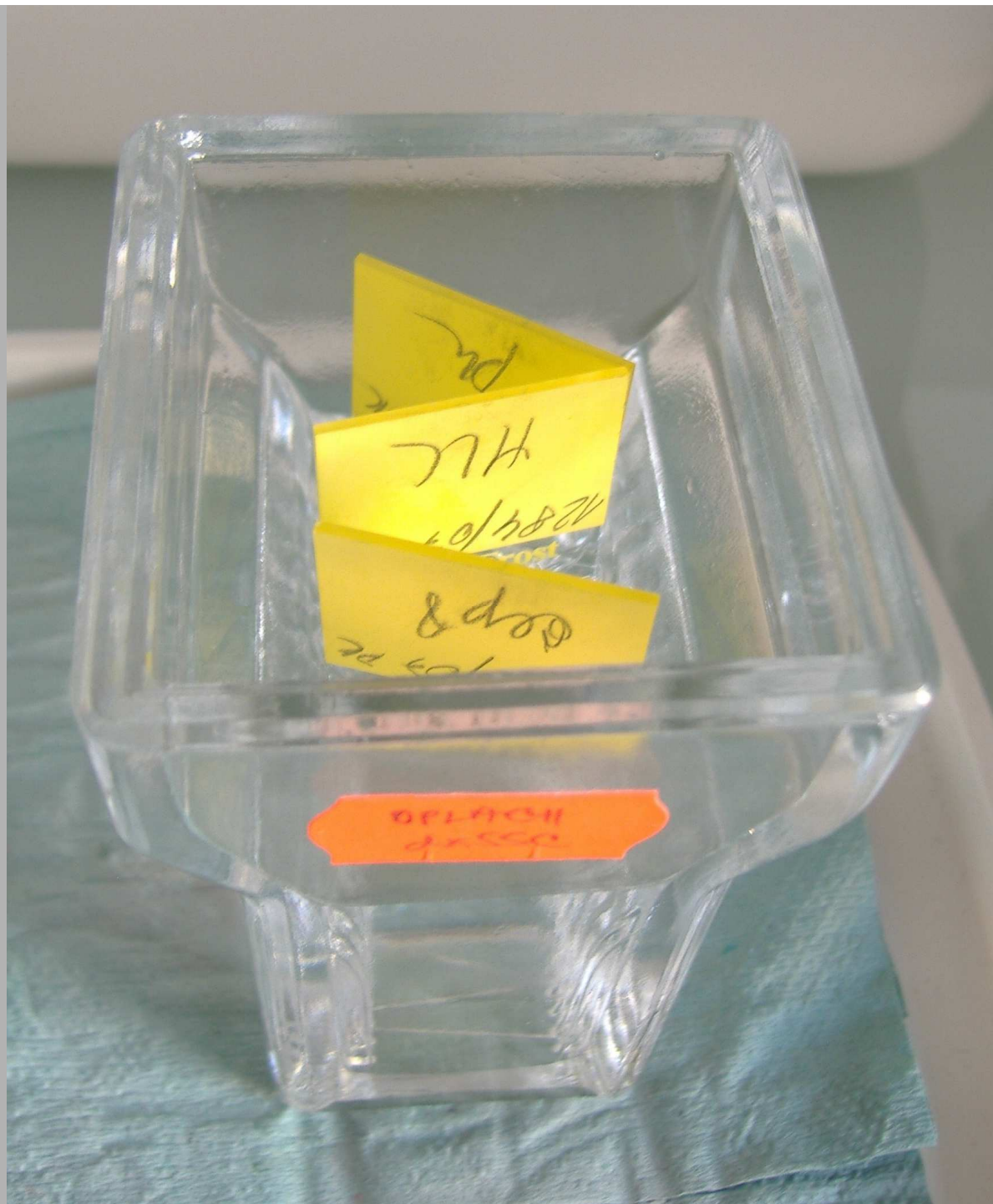


inkubace skel přes noc (1-2 dny) při 37°C



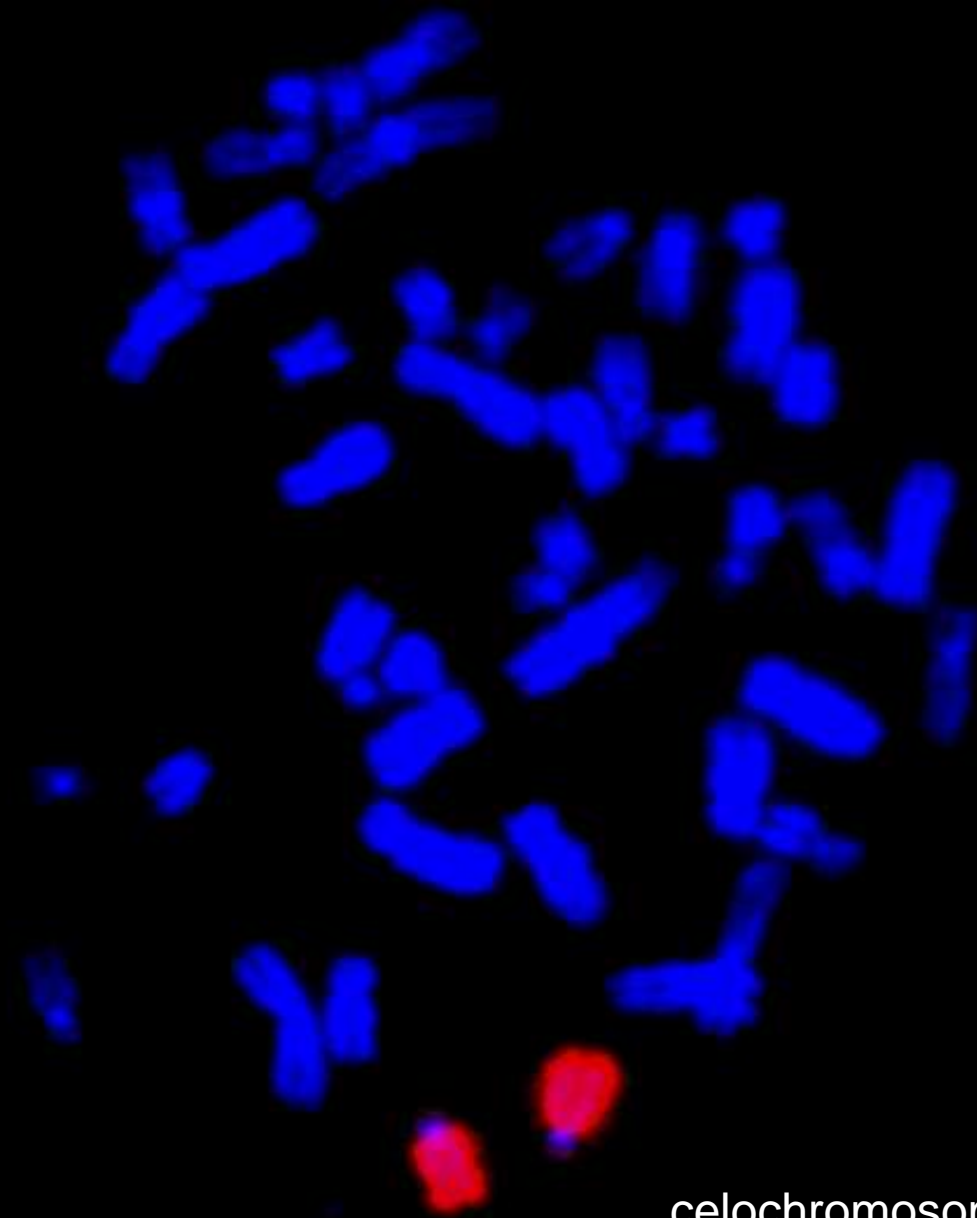
odmytí preparátů v 0,5xSSC - 4 min při 73°C

oplach preparátů v 2xSSC

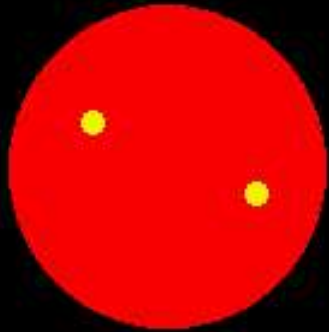




sušení preparátů ve tmě (v šuplíku☺)



celochromosomové sondy



Lokus specifické sondy

