

Interfázni FISH na buněčné suspenzi

1. Sklizení buněk

CHEMIKÁLIE

Fixativ – Methylalkohol p.a. a čistou kyselinu octovou ředit v poměru 3:1. Fixativ musí být připraven vždy čerstvý před sklizením buněk! Pro jiné účely lze krátkodobě uchovávat při 4 °C.

75mM KCl – 2,8 g chloridu draselného rozpustit v 500 ml sterilní destilované vody. Uchovávat při 4 °C. Před sklizením předeřhřát na 37 °C.

SKLÍZENÍ

1. Všechny centrifugace probíhají po dobu 10 minut při 1500 RPM a laboratorní teplotě.
2. Odstranit médium a dvakrát důkladně opláchnout buňky sterilním PBS (37 °C).
3. Převést buňky do suspenze a centrifugovat.
4. Odsát supernatant, pelet důkladně resuspendovat Pasteurovou pipetou a přidat 10 ml 75mM KCl předeřhřátého na 37 °C. Hypotonizace při 37 °C po dobu cca 30 minut.
5. Přidat 10 kapek fixativu, lehkým obrácením zkumavky promíchat a centrifugovat.
6. Odsát supernatant. Resuspendovat pouze lehkým zatřesením zkumavkou (buňky jsou v této chvíli náchylné k protržení!). Po kapkách přidat 10 ml fixativu. Promíchat kroužením.
7. Fixace 20 minut při pokojové teplotě. Poté centrifugovat.
8. Odsát supernatant a důkladně resuspendovat Pasteurovou pipetou. Po kapkách přidat 5 ml fixativu.
9. Fixace 10 minut při pokojové teplotě, centrifugovat.
10. Maximálně odsát supernatant. Doplnit fixativem na cca 1 ml (mléčné zakalení suspenze) a uskladnit při teplotě 4 °C.

2. Příprava preparátu

Příprava podložních skel

- Oplach v 70% etanolu, mechanické očištění kartáčkem.
- Oplach v destilované vodě.
- Naložit do skleněné kyvety s 70% etanolem a skladovat při 4 °C.
- Optimální je ponechat skla před použitím takto alespoň přes noc. Před nakapáním suspenze sklo důkladně utřít do sucha utěrkou na optiku (Micro Optic-Cleaner, Hama).

Příprava krycích skel

- Oplach v 70% etanolu, mechanické očištění, oplach v destilované vodě.
- Utřít do sucha utěrkou na optiku.

Příprava preparátu

Na vychlazené a nadýchnuté podložní sklo kápnout z výšky 1–3 kapky suspenze (dle hustoty suspenze) pod úhlem cca 40 °. Nechat volně schnout – ideálně alespoň do druhého dne.

3. FISH

CHEMIKÁLIE

Ethanolová řada – 70%, 80% a 96% ethanol

0,5xSSC (pH 7,2) – zásobní roztok 20xSSC ředit v dH₂O, upravit na pH 7,2

2xSSC (pH 7) – zásobní roztok 20xSSC ředit v dH₂O, upravit na pH 7

FISH – optimalizovaný protokol pro sondy Poseidon™ (Kreatech Diagnostics)

- 1) Zestaršení preparátu pomocí 2xSSC (Saline-sodium citrate, solný roztok citrátu sodného) při 37°C po dobu 30 minut.
- 2) Dehydratace v etanolové řadě (70 %, 80 % a 96 %) při laboratorní teplotě, 2 minuty pro každou koncentraci.
- 3) Nechat volně schnout – (ideálně do druhého dne). Poté aplikace sondy.
Od bodu 4 dále chránit preparát před světlem
- 4) Na spodní polovinu skla aplikovat 5 µl sondy (MYCN, XCE8, XCP8), uzavřít krycím sklem a oblepit rámovací hmotou Fixogum.
- 5) Kodenaturace (sondy a DNA preparátu) na kovové plotýnce při teplotě 75°C po dobu 3 minut.
- 6) Hybridizace ve vlhké komůrce přes noc.
Lze nahradit cca 4h hybridizací. Lepší výsledky jsou ale dosaženy hybridizací přes noc.
- 7) Odstranit rámovací hmotu a opatrně sejmout krycí sklo.
- 8) Odmytí nenavázané sondy – 0,5xSSC při 75°C po dobu 2 minut, opláchnutí v 2xSSC při RT po dobu 30s.
- 9) Nechat oschnout ve tmě.
- 10) Aplikovat 10 µl DAPI a hotový preparát uzavřít krycím sklem.

Fluorescenční detekce cytoskeletálních proteinů

CHEMIKÁLIE

Fixativum – 3% paraformaldehyd v PBS

Permeabilizace – 0,2% triton TX-100 v PBS

Blokovací roztok – 3% BSA (bovinní sérový albumin) v PBS

1. Nepřímá imunocytochemická detekce α -tubulinu (mikrotubuly, MT)

Značení buněk

- 1) Oplach v PBS - 2 x 1 min
- 2) Fixace 3% PFA - 20 min
- 3) Permeabilizace 0,2% triton TX-100 - 1 min
- 4) Oplach v PBS - 3 x 3 min
- 5) Blokování 2% BSA - 10 min (na parafilmu)
- 6) Inkubace s primární Ab (anti- α tubulin) - 60 min / 37°C (na parafilmu)
- 7) Oplach v PBS - 3 x 3 min
- 8) Inkubace se sekundární Ab (anti-myší IgG-Alexa488/Alexa568) - 45 min / 37°C (na parafilmu) - lze kombinovat s detekcí F-aktinu viz. krok 5 následující úlohy
- 9) Oplach v PBS - 3 x 3 min
- 10) Detekce DNA – Hoechst33342 – 3 min
- 11) Oplach v PBS – 1 x rychlý, + 1 x 3 min
- 12) Montovat v montovacím médiu DAKO

2. přímá detekce F-aktinu

Značení buněk

- 1) Oplach v PBS - 2x 1 min
- 2) Fixace 3% PFA - 20 min
- 3) Permeabilizace 0,2% triton TX-100 - 1 min
- 4) Oplach v PBS - 3 x 3 min
- 5) Inkubace s phalloidin-iFluor488/iFluor555 - 45min / 37°C (na parafilmu)
- 6) Oplach v PBS - 3 x 3 min
- 7) Detekce DNA – Hoechst33342 – 3 min

- 8) Oplach v PBS – 1 x rychlý, + 1 x 3 min
- 9) Montovat v montovacím médiu DAKO

Pozorování autofluorescence rostlinného a živočišného původu

MATERIÁL

pylová zrna, listy rostlin, šupiny z motýlího křídla.

Fluorescenční odlišení živých a mrtvých buněk

CHEMIKÁLIE

Hoechst33342 – 1 : 1000

Propidium jodid – 3µg/ml

Alternativa:

Propidium jodid – 3 µg/ml

Akridinová oranž – 5 µg/ml

Značení buněk

- 1) Oplach v PBS
- 2) Kapka barvicího roztoku na podložní sklo
- 3) Přiklopit krycí sklo s buňkami / inkubace 5 min