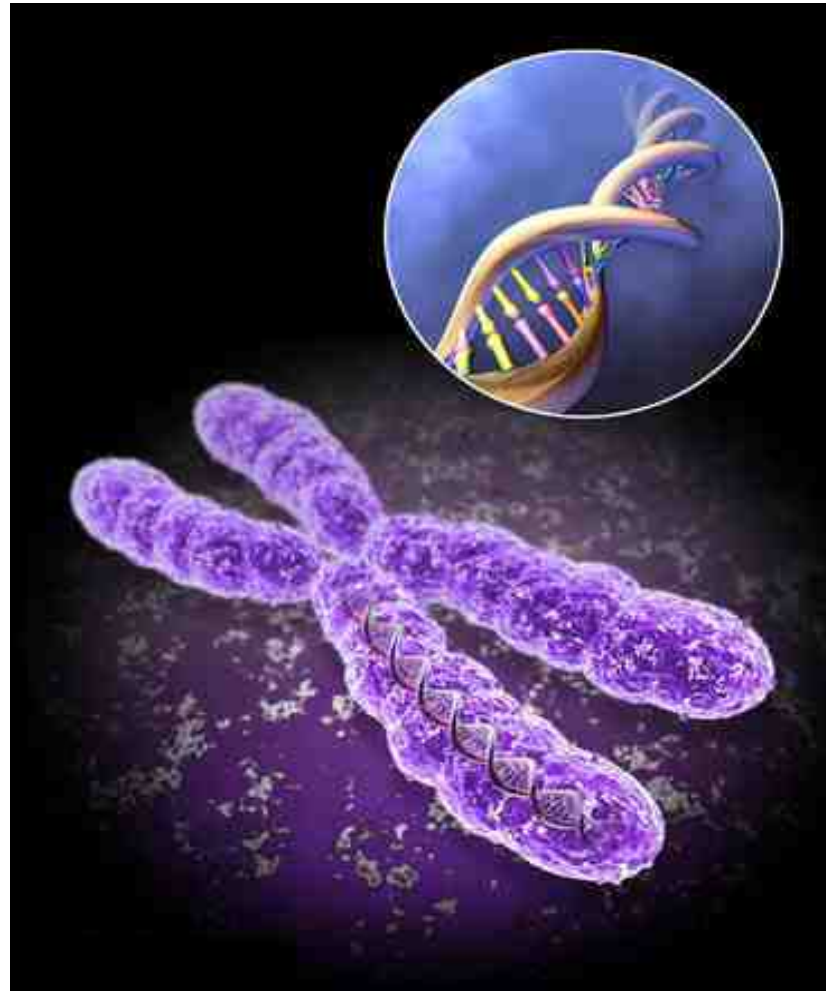




PROTOCOLLO FISH

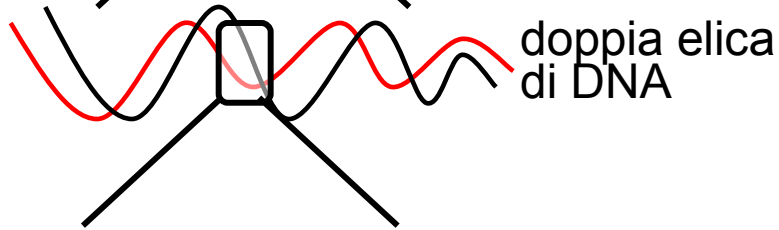
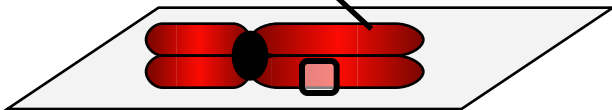


lezione 12



FISH

cromosoma sul vetrino

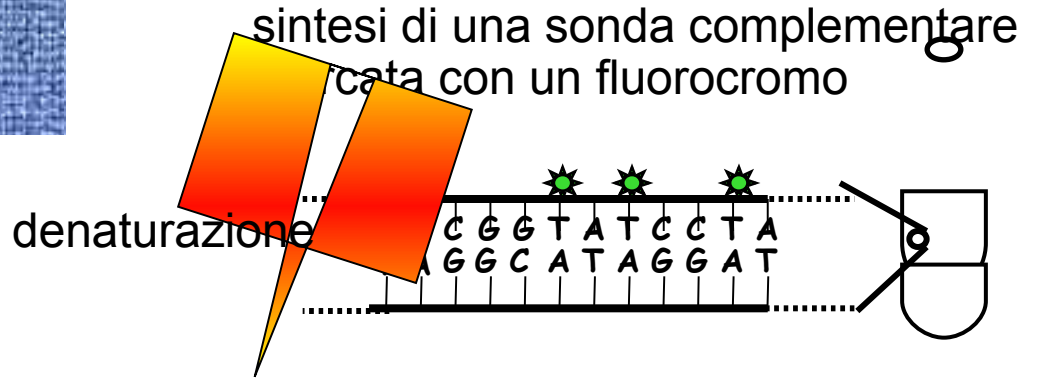


doppia elica di DNA

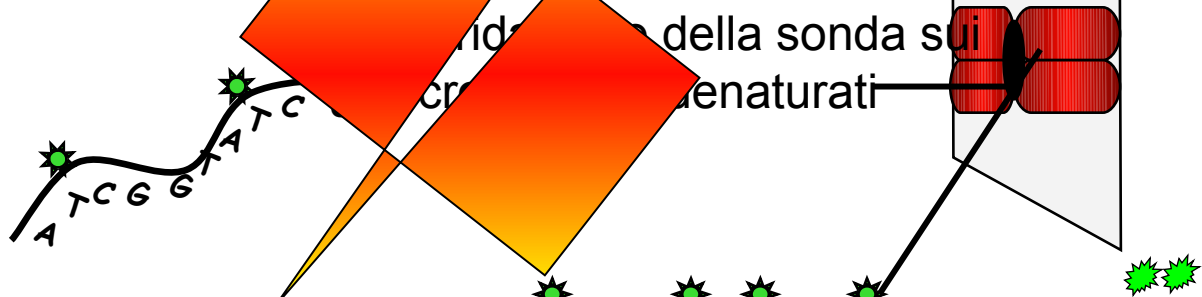
ATCGGTATCCTA
TAGGCATAGGAT

denaturazione

ATCGGTA
TAGGCAT



ATCGGTATCCTA
TAGGCATAGGAT



TAGGCATAGGAT

ATCGGTATCCTA
TAGGCATAGGAT

osservazione
del vetrino



ed adesso analizz...

passo il protocollo...

**PREPARAZIONE DEL
VETRINO**

**PREPARAZIONE DELLA
SONDA**

FISH

PREPARAZIONE DEL VETRINO

- 1) STRISCIO DEL V
- 2) INVECCHIAMEN
- 3) TRATTAMENTO
- 4) LAVAGGI E DEID

LULE

90°C

in camera umida



1) STRISCIO DEI VETRINI





2) TRATTAMENTO CON PEPSINA-HCl



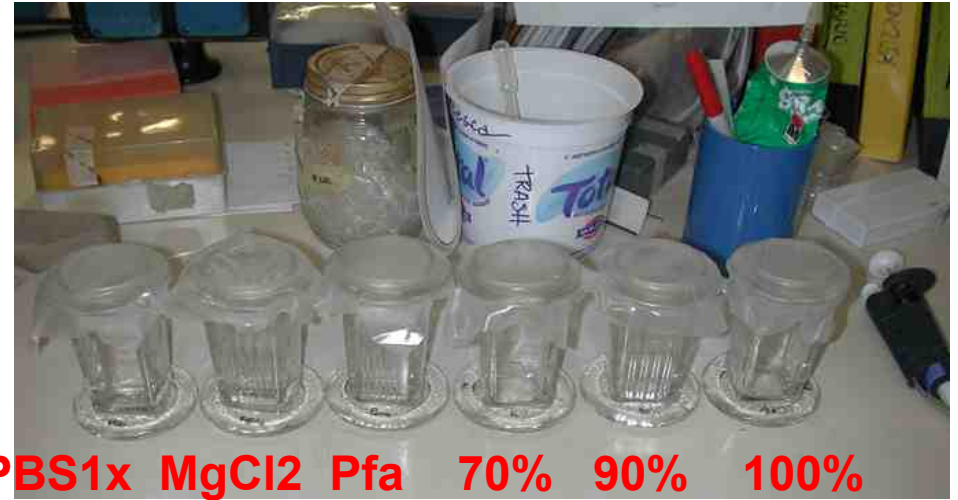
deposi-
dagiare I vetrini su apposite macchine
Vyses e aggiungere
la P-HCl su ogni vetrino

Porre un vetrino copri-oggetto 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%



Immergere i vetrini in ogni soluzione per 5min:

- 1) PBS1X
- 2) MgCl₂
- 3) PARAFORMALDEIDE
- 4) PBS1X
- 5) EtOH 70%
- 6) EtOH 90%
- 7) EtOH 100%

NB. Dopo il primo lavaggio in PBS1x 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 LB + antibiotico (cloramfenicolo 50mg/ml)



2. Prelevare con un'ansa sterile i batteri dal clone conservato in terreno semisolido (LB+Agar a 40°C) o in Glicerolo (-800°C).



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





2) ESTRAZIONE DEI BAC



1. centrifugare I batteri 10 min a 4000rpm



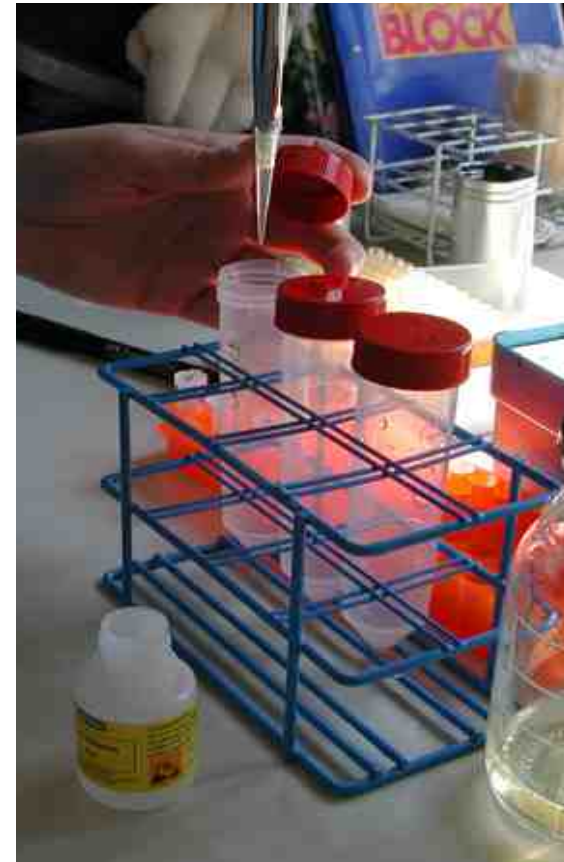
PELLET



2. eliminare il sovrnatante



3. aggiungere la resuspension solution





4. aggiungere su vortex



5. preparare delle eppendorf
col nome del bac



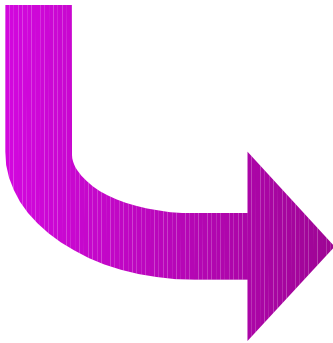
6.trasferire le cellule risospese
nelle eppendorf

7.aggiungere la soluzione di lis...



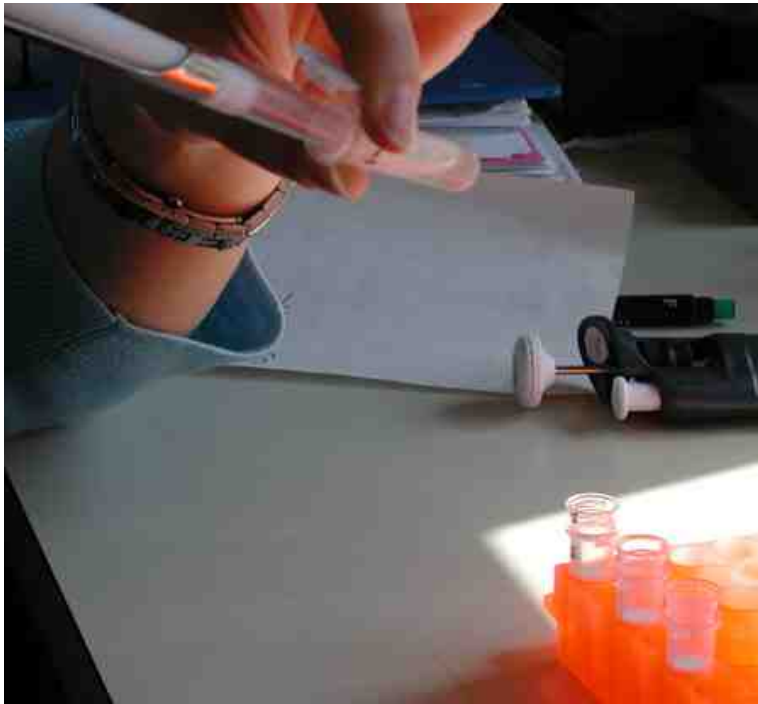


8. aggiungere la soluzione neutralizzante e invertire 10 volte
9. centrifugare a 13.000rpm per 10min





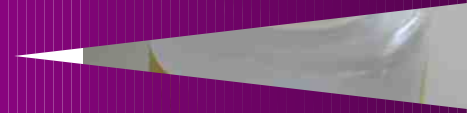
10.preparare delle nuove
ependorf da con
apposito filtrino



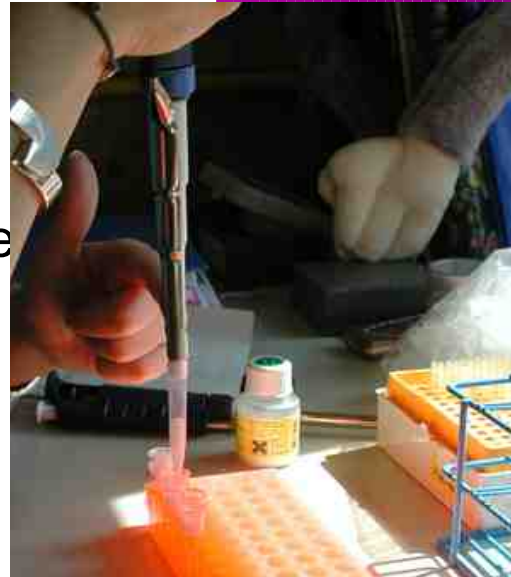
11.trasferire il sovratanante nelle
ependorf col filtrino



Agitare la matrix solution



12. Aggiungere la matrix e mescolare col puntale



13. centrifugare 30secondi a 13.000 rpm



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



NB: IL DNA E' NEL FILTRINO

15. Aggiungere nel filtrino il Wash Buffer+EtOH, centrifugare 1min a 13.000rpm ed eliminare il filtrato (2 volte)



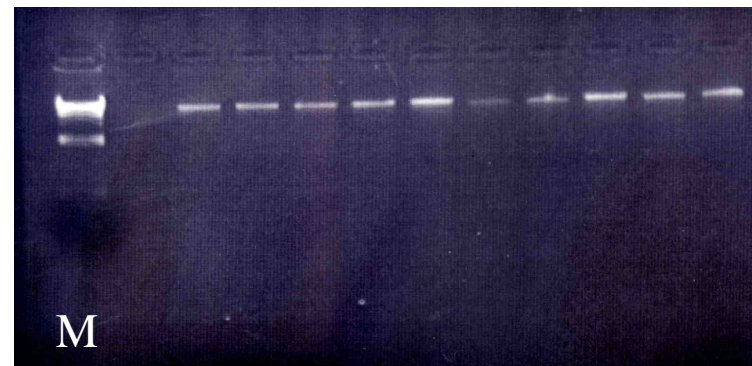


16.trasferire il filtrino in una nuova eppendorf con il nome del bac e aggiungere ddH₂O

17.attendere qualche min e centrifugare 1min a 13.000rpm quindi buttare il filtrino.

NB: IL DNA E' NEL FILTRATO

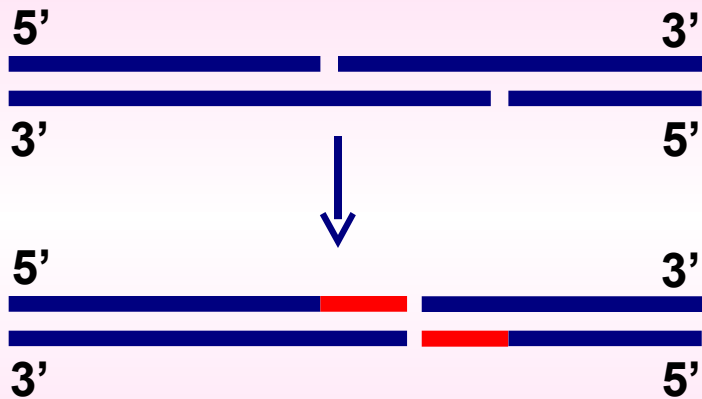
18.controllare la concentrazione del DNA su gel d'agarosio 1%





3) MARCATURA DELLA SONDA PER NICK TRANSLATION

LA MARCATURA SI PUO FARE IN MODO DIRETTO O INDIRETTO



I REAGENTI:

Buffer 10X

β-Mercaptoetanol

dACG

dUTP/fluorocromo

DNasi I

DNApolimerasi I



Incubare 2 ore a 150C

Controllare la marcatura del DNA sul gel d'agarosio 1%





4) PRECIPITAZIONE DELLA SONDA

SI SEPARA LA SONDA DALLA MIX DI MARCATURA

*OPERIAMO UNA PRECIPITAZIONE ALCOLICA A
SCAMBIO IONICO*

Reagenti:

DNA marcato

Cot-I

SSD

NaAc

EtOH



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 -800C o per almeno 30min a -200C
(la bassa temperatura facilita la precipitazione del DNA)
4. Centrifugare 10min a 13.000 rpm
5. Aspirare il sovrnatante 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 90-950C a circa 700C

6) IBRIDAZIONE OVER NIGHT (O.N.)

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





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 similarita' tra le sequenze ibridate (sonda/cromosomi):

ALTA STRINGENZA

- 3 lavaggi in una soluzione 0,1xSSC a 600C

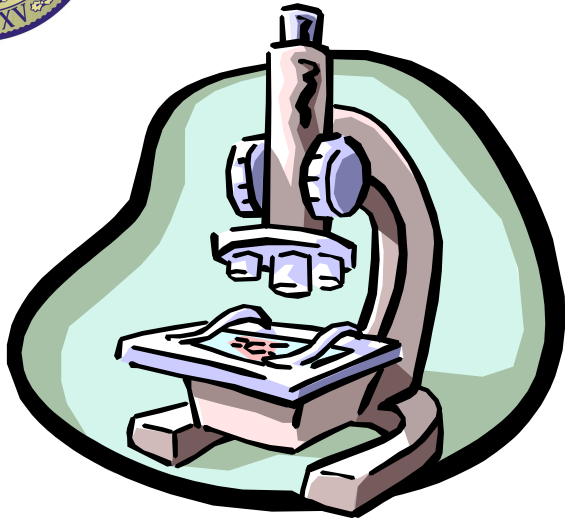
BASSA STRINGENZA

- 3 lavaggi in una soluzione 50%formammide/2xSSC a 370C
- 3 lavaggi in una soluzione 2xSSC a 420C

8) COLORAZIONE DEI CROMOSOMI

1. Colorare I vetrini in DAPI per 5 minuti
2. Montare I vetrini con ANTIFADE

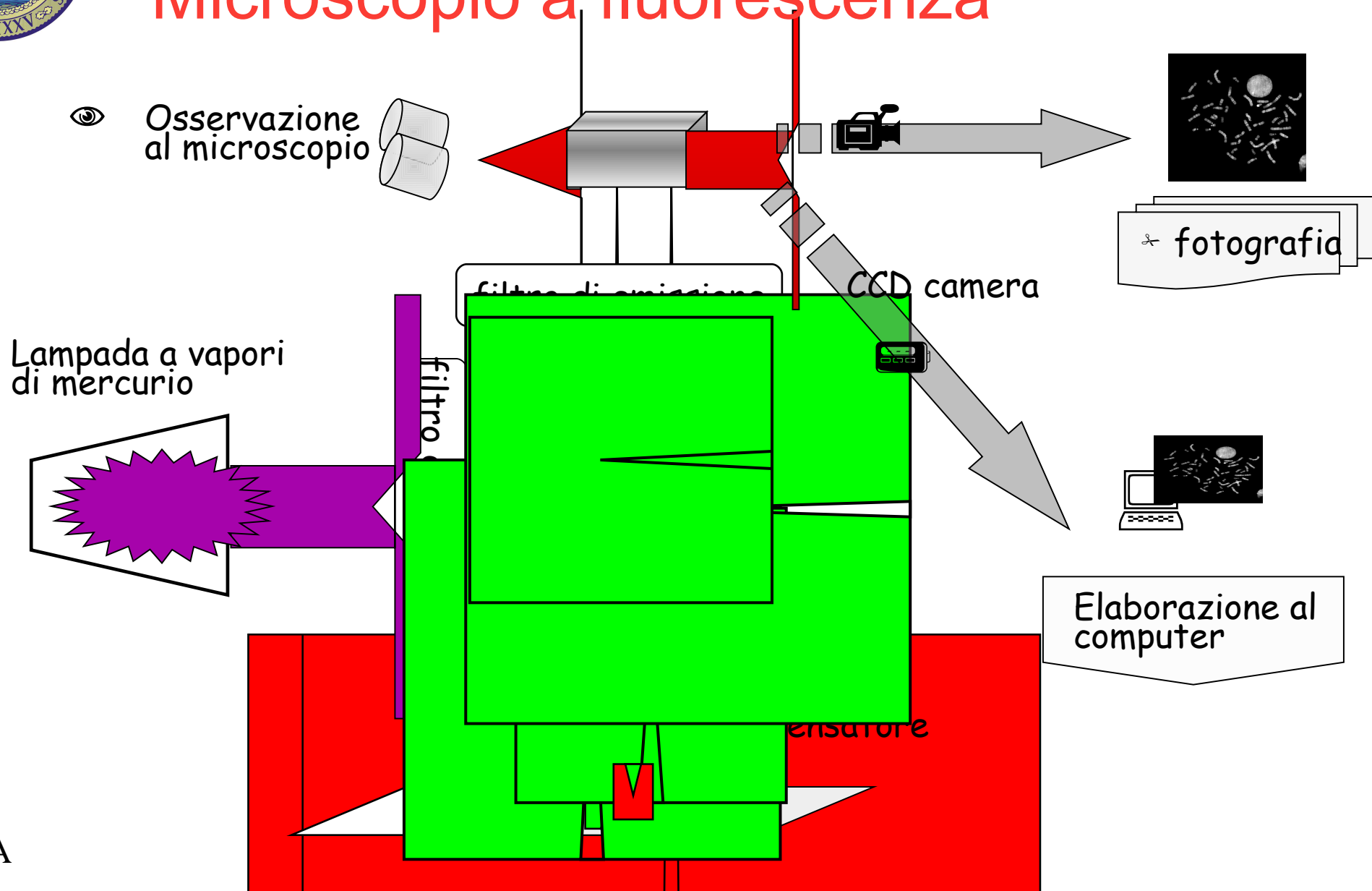




I vetrini sono pronti per la visione al microscopio
fluorescenza...



Microscopio a fluorescenza



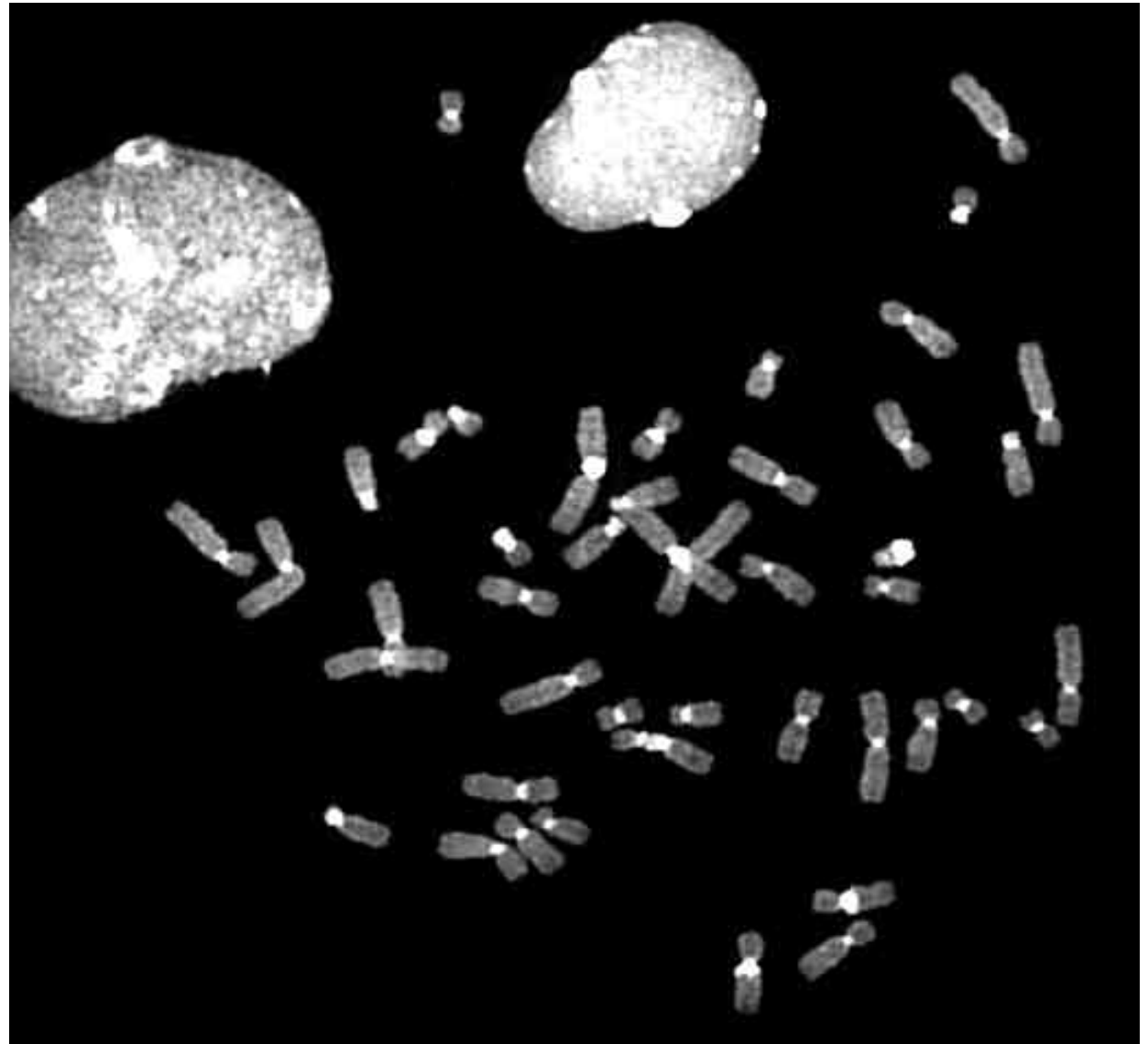


Metafase in DAPI

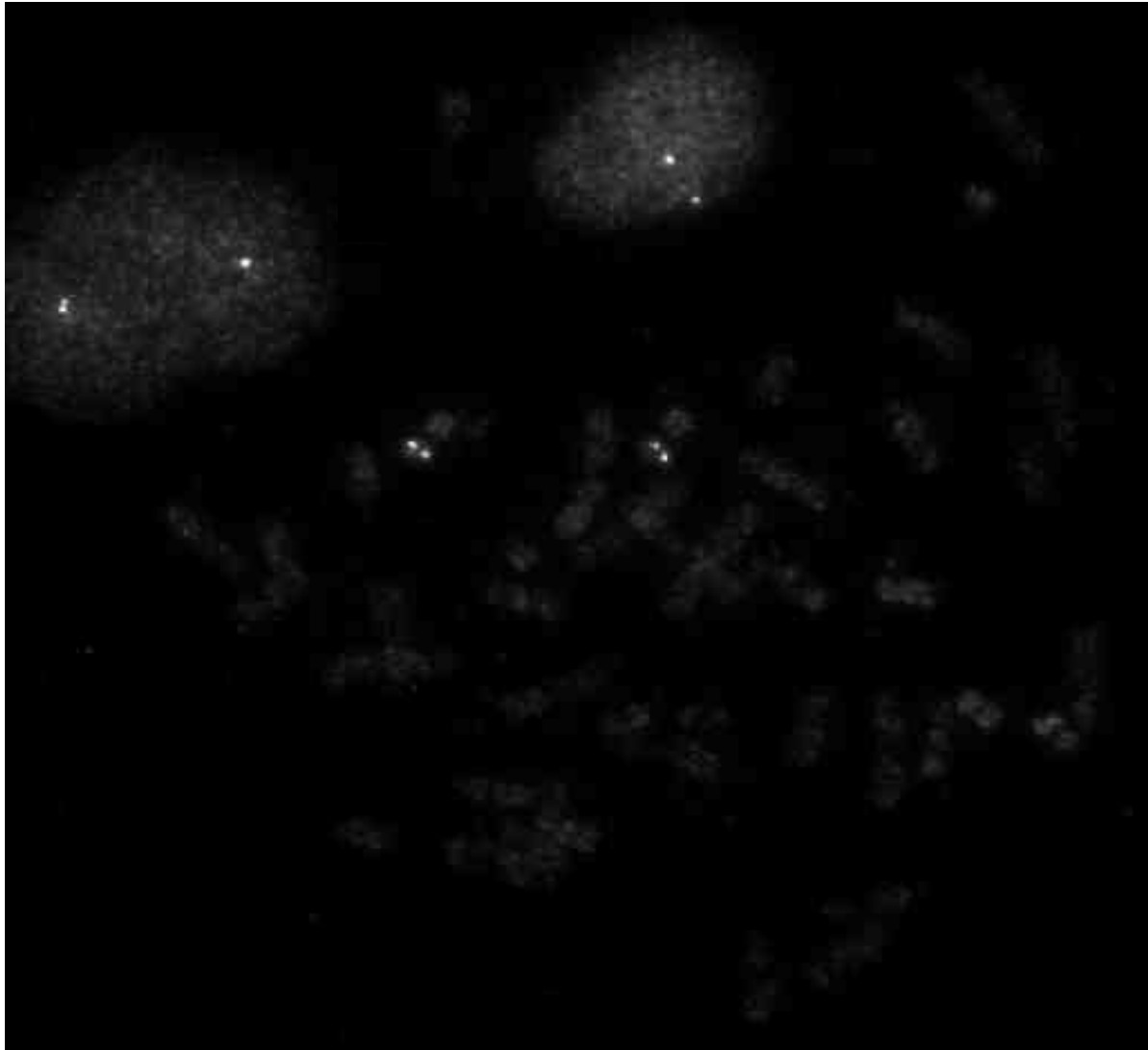
Cromosomi

1. denaturati

2. colorati con DAPI



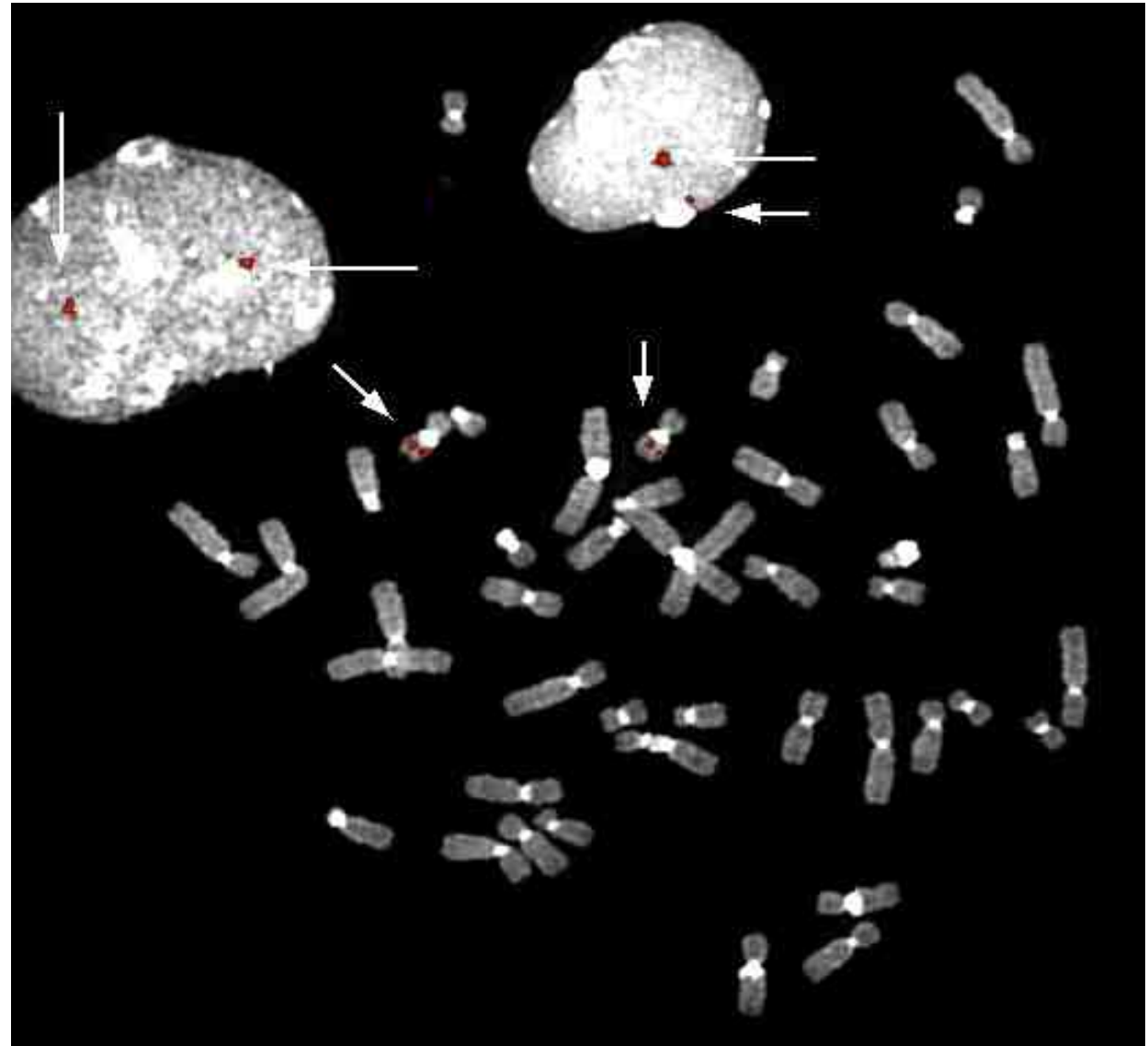
Sonde puntiformi fluorescenti





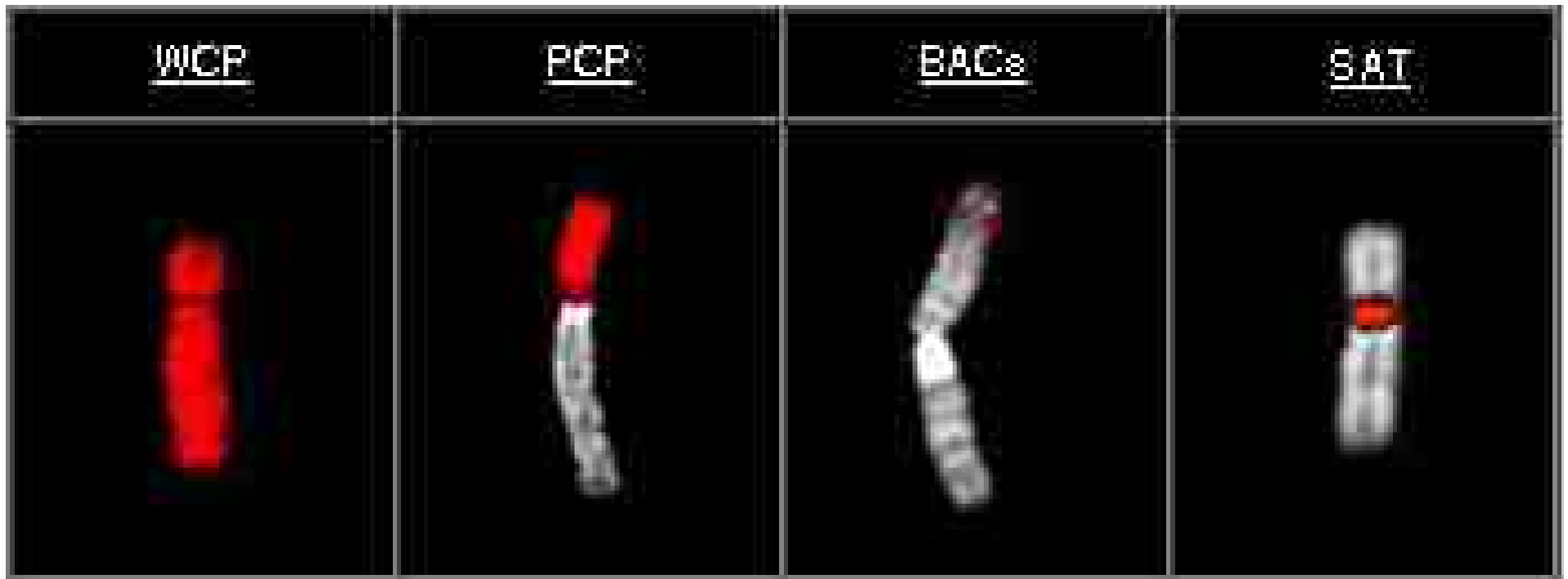
Merge

Sovrapposizione
dell'immagine della
sonda sull'immagine
del DAPI



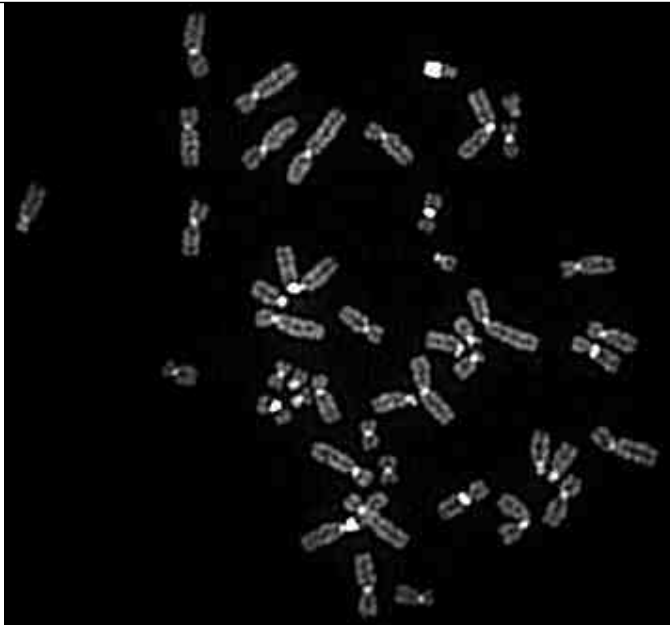


SONDE PER FISH

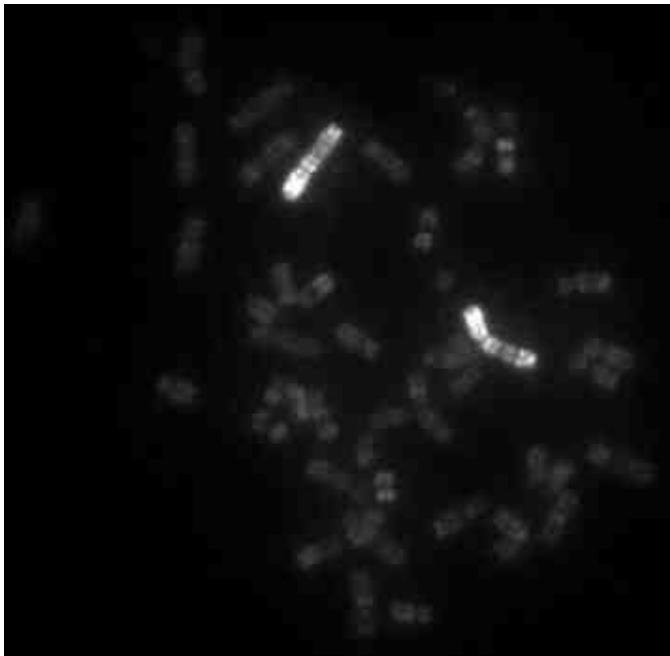




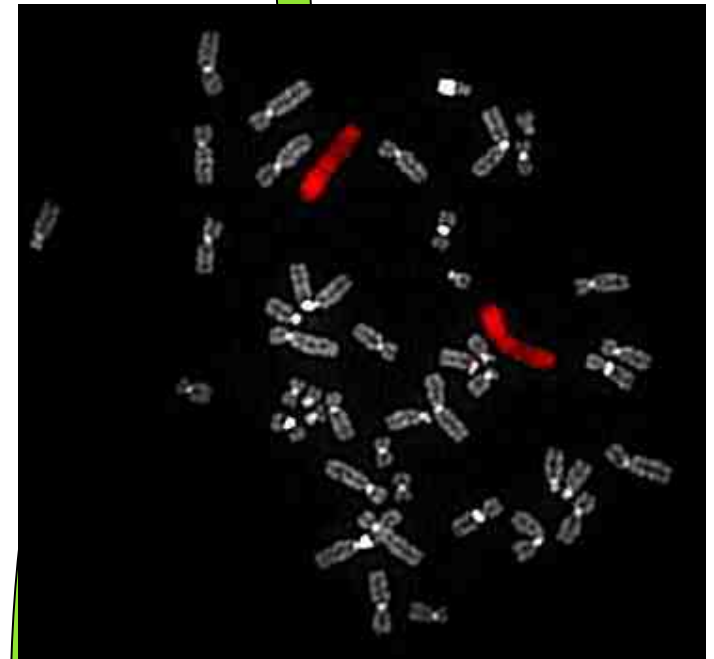
DAPI



SONDA



MERGE



WCP



DAPI



SONDA



PCP

MERGE

