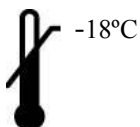




Návod k použití

IntellMed, s.r.o.,
Václavské náměstí 820/41
110 00 Praha 1
IČ: 27780317
DIČ: CZ27780317

Kit se skládá z:

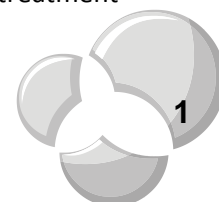
Přímo značené fluorescenční sondy v hybridizačním pufru (značené fluorochromem Orange nebo Green)

Potřebné chemikálie a vybavení:

- Etanol
- Deionizovaná voda
- Kyselina octová a metanol
- Rubber cement
- Hybridizér
- Vodní lázeň
- Termoblok
- Inkubátor (37 °C)
- Montážní médium s DAPI
- **Fluorescenční mikroskop s odpovídajícím filtrem** (emisní/excitační maximum pro sondy značené fluorochromem Orange je 588nm/559nm, emisní/excitační maximum pro sondy značené fluorochromem Green je 524nm/497nm)
- **70%, 85%, and 96% etanol** - v případě použití klasických barvicích nádobek (Copplin jar) je dostačující množství 70 ml každého roztoku etanolu
- **0.2M HCl**
- **20xSSC, pH 5.3**
- **2xSSC, pH 7.0**
- **1M NaSCN**
- **0,9% NaCl, pH 2.0**
- **Pepsin**
- **10% formaldehyd**
- **Denaturační roztok:** 49 ml formamid, 7 ml 20xSSC, 14 ml deionizovaná voda, upravit pH na 7-8, skladovat při teplotě 2-8°C (max. 7 dní); před použitím zahřát na teplotu 73±1 °C.
- **Promývací roztok I (0.4x SSC / 0.3% NP-40):** 20 ml 20xSSC, 3 ml NP-40, doplnit do 1 litru purifikovanou vodou, upravit pH na 7,0-7,5, skladovat při laboratorní teplotě (max. 6 měsíců); před použitím zahřát na teplotu 73 ± 1 °C.
- **Promývací roztok II (2x SSC / 0.1% NP-40):** 100 ml 20xSSC, 1 ml NP-40, doplnit do 1 litru purifikovanou vodou upravit pH na 7,0 ± 0,2 °C skladovat při laboratorní teplotě (max. 6 měsíců)

Postup:

- Pokud použijeme čerstvý materiál (tkáň, buněčnou linii atd.) je třeba po nanesení na podložní sklíčko (nátěr, otisk, cytospin, mitotická skla, atd.) a zaschnutí preparát zafixovat ve směsi metanol a kyselina octová, v poměru 3:1, po dobu 10 minut. Fixační směs připravujeme vždy před použitím. Po fixaci necháme preparát volně oschnout. Pro další postup viz Postup přípravy čerstvého materiálu.
- Pokud použijeme parafinové řezy, je potřeba preparát nejdříve deparafinizovat a provést pretreatment vzorku. Pro další postup viz Postup přípravy pro parafinizovanou tkáň.



Postup přípravy čerstvého materiálu (mitotická skla, cytospin, nátěr, atd.):

1. Preparáty inkubujeme v denaturačním pufu po dobu 5 minut, při teplotě $73 \pm 1^\circ\text{C}$.
2. Ihned po vyjmutí vložíme preparát do roztoku 70% etanolu na 1 minutu, poté na minutu do 85% etanolu a nakonec do 96% etanolu, kde můžeme preparát nechat do té doby, než budeme připraveni nanést sondu (nejméně však jednu minutu).
3. Skla vyjmeme z etanolu, lehce osušíme přitisknutím hrany skla na savou podložku, umístíme na termoblok o teplotě $45-50^\circ\text{C}$ a necháme odpařit zbývající etanol (3-5min).

Postup přípravy pro parafinovanou tkáň (parafinové řezy):

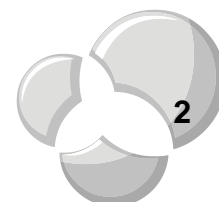
1. K odstranění parafinu použijeme xylen 3x po dobu 7 minut.
2. Rehydratujeme v 96% etanolu 2x po dobu 5 minut.
3. Skla vyjmeme z etanolu, lehce osušíme přitisknutím hrany skla na savou podložku, umístíme na termoblok o teplotě $45-50^\circ\text{C}$ a necháme odpařit zbývající etanol (3-5min).
4. Skla ošetříme v 0,2M HCl po dobu 20 min, pak promyjeme v deionizované vodě 3 min a v 2xSSC 3 min.
5. Skla vložíme do 1M NaSCN a při teplotě 80°C inkubujeme po dobu 20 min, pak promyjeme v deionizované vodě 1 min a 2x v 2xSSC 5 min.
6. Pro natrávení tkáně vložíme skla do 0,05% pepsinu v 0,9% NaCl, pH 2.0 a inkubujeme při 37°C po dobu 40 minut, pak promyjeme 2x v 2xSSC po dobu 5 min.
7. Skla ošetříme v 10% formaldehydu 10 min, promyjeme 2x v 2xSSC 5 min a opláchneme na několik sekund v deionizované vodě a vysušíme na termobloku o teplotě $45-50^\circ\text{C}$ po dobu 10 min.

Kodenaturace a hybridizace:

1. Naneseme sondu v takovém množství, aby překryla testovaný vzorek, a překryjeme vyčištěným krycím sklíčkem (na krycí sklíčko velikosti max. 22x22 mm, použijeme 10 μl sondy). Po zalepení je třeba krycí sklíčko pokrýt vhodným rubber cementem.
2. Denaturujeme připravená skla při 85°C 1 min pro parafinové řezy nebo při 75°C 1 min pro čerstvý materiál.
3. Inkubujeme přes noc při 37°C v hybridizéru.

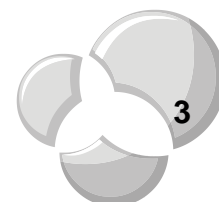
Odmytí nenavázané sondy:

1. Odlepíme krycí sklíčko a preparát ponoříme do promývacího roztoku I (0,4x SSC/ 0,3% NP-40), vyhřátého na $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Asi 3-5 s sklíčko s preparátem v roztoku lehce protřepáváme. Inkubujeme 2 minuty.
2. Přeneseme do promývacího roztoku II (2x SSC/0,1% NP-40), opět asi 3-5 s protřepáváme a inkubujeme 30 sekund.
3. Lehce osušíme přitisknutím hrany skla na savou podložku a necháme bez přístupu světla volně zaschnout.
4. Naneseme DAPI, jehož smyslem je podbarvit jádra tak, aby je bylo možno pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu. Pokud nepoužíváte komerční DAPI barvivo/montážní medium, lze preparáty např. barvivem Hoechst. Přebytečné barvivo je pak nutno odmyt a použít montážní medium, jako je např. pufrovaný glycerol.
5. Překryjeme krycím sklíčkem a odečítáme ve fluorescenčním mikroskopu.



**Možné problémy a jejich řešení:**

Problém	Možné řešení
Zkřížená hybridizace	Zvyšte teplotu promývacího roztoku I o 2°C. Snižte teplotu denaturace o 2°C.
Slabé či žádné signály	Zvyšte teplotu denaturace o 2°C. Prodlužte dobu hybridizace. Zkraťte dobu odmývání. Ověřte pH roztoků. Ověřte, zda preparát se sondou či sonda samotná nebyla vystavována přímému světelnému záření. Ověřte, zda byla sonda uchovávána při -20°C. Po fixaci ponořte preparát na maximálně 1 minutu do 70% kyseliny octové a poté nechte zaschnout. Tento krok doporučujeme zejména u hybridizace na mitotické preparáty, u kterých nedošlo k úplnému odstranění cytoplazmatických membrán. Preparát je staršího data a nebyl uchováván při -80°C (neplatí pro parafinové řezy).
Difúzní signály	Snižte teplotu denaturace o 2°C. Zkraťte dobu denaturace o několik sekund. Ověřte pH roztoků.
Špatná morfologie vzorku	Snižte teplotu denaturace o 2°C. Zkraťte dobu denaturace o několik sekund. Prodlužte dobu fixace preparátu.
Nečistoty na pozadí či „zamlžení“ vzorku po hybridizaci a promytí	Došlo ke smíšení vodného roztoku s montážním médiem. Po odmytí vzorku hybridizaci nechte preparát dokonale zaschnout. Ověřte pH odmývacích roztoků a denaturačního pufru. Prodlužte dobu odmývání po hybridizaci.



**Bezpečnostní informace:**

DNA sondy obsahují:

formamid, který je teratogenní. Zamezte proto kontaktu sondy s kůží. Při práci používejte ochranný oděv a rukavice.



R61

S24, S 25, S35, S36, S 37, S 39, S 45, S 53

Pro užití DNA sond je potřeba následujících nebezpečných látek, které však nejsou součástí výrobku ani nejsou spolu s výrobkem dodávány:

NP-40, součást promývacích roztoků, je dráždivý stejně jako **DAPI** barvivo. Zamezte proto kontaktu sondy, promývacích roztoků a DAPI s kůží a nevdechujte. Při práci používejte ochranný oděv a rukavice.



R 36, R 38, R 37 S 26, S 27, S 28, S 29, S 30, S 33, S 46,

Likvidace nespotřebovaného nebo proexspirovaného výrobku:

Nespotřebovaná činidla a odpad se obecně řadí mezi zvláštní odpad a likvidují se v souladu s celostátními a místními předpisy. S kontaminovanými odpady musí být zacházeno stejně jako s produktem samotným.

