

Гибридизация биотинилированной пробы *in situ* с метафазными хромосомами человека

Авторы работы : Лушникова А.А., Антоненко В.Г.

Организация: РОНЦ им.Н.Н.Блохина,РАМН, Медико-генетический центр РАМН.

Для получения проб, меченных биотином, использовали наборы фирмы НП АО "Силекс М" (Россия) "Нерадиоактивное мечение ДНК Био-Рендомпрайм" и наборы фирмы Life Technologies (USA) "Bio Nick/TM Labelling System". Пробы метили согласно рекомендациям производителей.

Стандартные препараты культивированных фибробластов или лимфоцитов окрашивали для идентификации хромосом по Гимза и после фотографирования (документирования) удачных метафаз деконтрастировали препараты 70% этанолом [1, 2]. Препараты, предназначенные для гибридизации *in situ*, рекомендуется хранить в коробках при комнатной температуре не более 1-2 недель. Перед гибридизацией препараты дегидратируют 5 мин в 10 mM PBS (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4).

Протокол подготовки образцов для гибридизации и проведение гибридизации

1. Стекла с препаратами помещают в 0,02 M HCl (кислоту разводят в воде) и инкубируют препараты 10 мин.
2. Стекла переносят на 1,5 мин в PBS с 0,01% Triton X-100
3. Стекла с препаратами 2-3 раза промывают в PBS, погружая их в стакан объемом 200-250мл.
4. Инкубируют препараты 10 мин при +37 °С в растворе протеиназы К (100 мкг/мл в ТЕ). Перед нанесением раствор протеиназы К прогревают 10 мин при +37 °С, наносят на препараты пипеткой и прикрывают покровными стеклами. Стекла помещают во влажную камеру (на дно камеры наслаивают небольшое количество воды, а стекла размещают горизонтально на подставках) и инкубируют в термостате при +42 °С. Важно, чтобы препараты не высыхали и покровные стекла легко отделялись при промывках.
5. Протеиназу инактивируют, помещая образцы на 5 мин в раствор глицина в PBS (2 мг/мл).
6. Стекла промывают, помещая их на 15 сек в холодную (+4 °С) 20%-ную уксусную кислоту. Эта промывка удаляет эндогенную кислотную фосфатазу.
7. После обработки уксусной кислотой стекла 2-3 раза промывали по 5 мин в стаканах с PBS. Пока идет промывка стекол уксусной кислотой готовится буфер для гибридизации. Для этого прогревают **гибридизационный буфер х2** (X4 SSC, X2 раствор Денхардта (0,04% поливинилпирролидон, 0,04% фиколл тип 400, 0,04 % BSA), 600 мкг/мл ДНК спермы лосося) до +37 °С и разводят его деионизированным формамидом 1:1. Этот раствор можно хранить в аликвотах при -20 °С.
8. Пробу для гибридизации денатурируют 5 мин в кипящей водяной бане, быстро переносят для охлаждения в лед и добавляют в прогретый до +37 °С гибридизационный буфер. Конечная концентрация пробы при размере ДНК до 1 т.п.н. должна быть 400-500 нг/мл.
9. Перед нанесением пробы рекомендуется поместить стекла с препаратами на 1 сек на горячий столик с температурой поверхности +90 - +100 °С.
10. Нанести 2-30 мкл пробы в гибридизационном буфере на препарат, покрыть чистыми покровными стеклами, гибридизовать во влажной камере при +42 °С в течение 4-5 часов. Как правило, лучшие результаты дает более длительная гибридизация (в течение ночи).
11. Промыть стекла 2-3 раза по 5 мин в стаканах с раствором X1 SSC, 0,1 % SDS при +42 °С.
12. Промыть стекла 2 раза по 10 мин в стаканах с 0,1% SDS при +42 °С.

Окраска препаратов после гибридизации с биотинилированной пробой

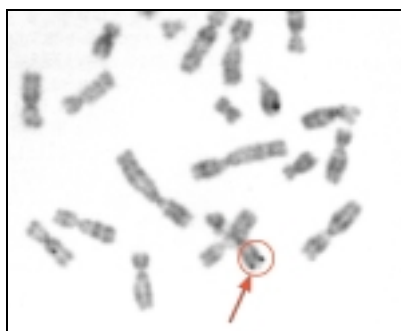
Для выявления результатов гибридизации использовали набор фирмы НП АО "Силекс М" "Нерадиоактивное определение ДНК"

Протокол выявления препаратов, гибридизованных с биотинилированной пробой

1. На стекла с препаратом наносят X1 буфер #1 и оставляют стекла с буфером на 1 мин, затем смывают капли тем же буфером при помощи пипетки.
2. Инкубируют препараты 30 мин в блокирующем буфере (100 мкл буфера на 1 см² поверхности образца)
3. Промывают препараты X1 буфером #1 при помощи пипетки, по 1-2 мл буфера на препарат.
4. Разводят конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза в X1 буфере #1 в соотношении 1:2000 и наносят на препараты (по 100-200 мкл на 1 см² поверхности образца) и накрывают покровными стеклами.
5. Инкубируют препараты 30 мин при комнатной температуре.
6. 2-3 раза промывают препараты X1 буфером #1.
7. Наносят на препараты X1 буфер #2 и инкубируют в течение 2 мин при комнатной температуре.
8. Готовят красящий раствор : 10,5 мкл субстрата 1 + 5 мкл субстрата 2 в 1 мл X1 буфера #2.
9. Равномерно наносят по 100-200 мкл красящего раствора на каждый препарат, прикрывают покровным стеклом и инкубируют в плотно закрытой темной камере в течение 2,5-3 часов.
10. Стекла споласкивают дистиллированной водой, (при погружении препаратов в стакан с водой покровные стекла должны легко отделяться от предметных) и высушивают на воздухе.
11. Препараты просматривают под микроскопом с фазовым контрастом.

Литература:

1. Залетаева Т.А., Кулешов Н.П. Современные методы хромосомного анализа в клинико-диагностических исследованиях. учебное пособие Минздрава РФ и Российской академии последипломного образования. Москва, 1994.
2. Молекулярно-клиническая диагностика Под ред. С.Харрингтона и Дж.Макги. Изд-во «Мир», 1999.



На снимке показан пример гибридизации метафазных хромосом из лимфоцитов человека с меченой bio-14 d АТФ пробой длиной 700 п.н..