



PROTOCOLO DE UTILIZACIÓN **Hibridación para cortes de tejidos preservados enparafina**

Materiales Provistos:

- ADN marcado con moléculas fluorescentes (sonda).
- Buffer de Hibridación
- Reactivos para preparar solución de montaje (Antifade y DAPI)
- Sales para preparar 80ml de Buffer de Desparafinado*
- Sales para preparar 80ml de Buffer de Pretratamiento*

*ver protocolos de preparación mas abajo.

Materiales extras requeridos:

- 2XSSC*
- Soluciones de etanol 70, 90 y 100%
- Agua destilada
- Pepsina 0.5%*
- Detergente no-iónico
- pH-metro o papel para medir pH
- Cubreobjetos
- Soluciones de enjuague (1 y 2)*
- Cemento de contacto removible
- Tubos 0,2 o 0,5ml
- Recipientes para enjuagues (*Coplin*)
- Aceite de inmersión
- Cámara húmeda
- Termómetro

*ver protocolos de preparación mas abajo.

Equipamientos requeridos:

- Microscopio de fluorescencia: No siempre un microscopio utilizado en reacciones de inmunohistoquímica u otro tipo de análisis con fluorescencia resulta adecuado. Los requerimientos para observar correctamente una reacción de FISH son los siguientes:
 - Fuente de Excitación: Se recomienda una lámpara de mercurio de 100 Watt con una vida útil de 200horas. Es necesario que una vez colocada, la lámpara sea alineada correctamente.
 - Objetivos: Para la ubicación del blanco (interfases o metafases) se recomiendan objetivos de 10, 20 y/o 40X. Para el análisis de la reacción es necesario un objetivode inmersión especial para fluorescencia con una apertura numérica $\geq 0,75$.

- Filtros de excitación-emisión: Cada fluorocromo observado requerirá de diferentes filtros. Los requerimientos para nuestras sondas se muestran en el cuadro a continuación:

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Verde	501	523
Rojo	550	570
Rojo Texas*	589	615
DAPI	350	470

*Sólo por indicación del cliente

- Micropipetas (1-10µl o similar)
- Microcentrífuga
- Vórtex
- Timer
- Baño de inmersión
- Incubadora 37°C)
- Placa termostática o hibridizador

Preparación de soluciones extras:

Buffer de Deparafinado

Agregar las sales provistas en el tubo rotulado "Buffer de Deparafinado" a 70ml de H₂O ultrapura.

Agregar de 400ul de detergente no iónico (NP40, Tween o similar) Llevar a pH 8 con HCl.

Completar hasta volumen final (80ml) con H₂O ultrapura.

- Luego de preparado mantener en heladera a 4°C

Buffer de Pretratamiento:

- Agregar las sales provistas en el tubo rotulado "Buffer de Pretratamiento" a 50ml de H₂O ultrapura.
- Agregar 80 ul de Tween o similar
- Llevar a pH 8.5 con HCl.
- Completar hasta volumen final (80ml) con H₂O ultrapura.
- Luego de preparado, mantener en heladera a 4°C

Pepsina

Solución Stock: 10% [0.1g/ml]

Diluir 0.1g de pepsina en 1ml de Agua Ultrapura (**Importante el pH debe ser = 2**)

- Luego de preparado guardar a -20°C

Solución de trabajo: 0.5% [5mg/ml]

Pepsina solución Stock: 4ml

HCl 12N (fumante): 0.66ml

H₂O destilada: 76ml (**Importante el pH final debe**

ser = 2)

- Luego de utilizar, guardar a 4°C durante no más de 4 usos.

2XSSC:

Cloruro de Sodio (NaCl) 300mM Citrato de Sodio
(Na₃C₆H₅O₇) 30mM

Ajustar a pH:7 con Acido clorhídrico (HCl) 1N

- Luego de preparado, mantener en heladera a 4°C

Enjuagues 1 y 2:

En un coplin adecuado para 80ml, agregar 80ml de 2XSSC y 0,080ml de detergente no-iónico.

- Luego de preparado, mantener en heladera a 4°C

Precauciones y advertencias (Leer atentamente):

- Reactivo analítico. Para uso en investigación solamente. Este producto NO está probado para uso diagnóstico o terapéutico.
- Las reacciones así como la interpretación de las mismas deben ser realizadas por personal idóneo debidamente entrenado.
- Todas las muestras biológicas deberían ser tratadas como posibles transmisores de agentes infecciosos.
- Se debe evitar la exposición de la muestra a ácidos o bases en alta concentración así como también al calor extremo. Estos factores dañan el DNA y pueden causar el fallo de la reacción de FISH.
- Una vez extraída la alícuota a utilizar, la sonda debe ser guardada nuevamente a -20°C.
- La falla u omisión de cualquiera de los pasos del protocolo detallado más abajo puede generar resultados erróneos o inaceptables.
- Las soluciones de enjuague pos-hibridación (ver protocolo) deben ser renovadas periódicamente debido a que son propensas de contaminación.
- El buffer de hibridación contiene formamida, un teratógeno, por lo que debe evitarse el contacto con la piel y las mucosas.
- Se recomienda el uso de guantes y chaqueta de trabajo durante todo el proceso.
- Es necesario controlar siempre la temperatura de las soluciones que se utilizan calientes.
- Todos los materiales peligrosos deben ser descartados de acuerdo a las normativas de su institución.

IMPORTANTE:

Puntos a tener en cuenta previos a la Hibridación in situ Fluorescente

- La muestra debe ser fijada inmediatamente luego de extraída. Periodos entre extracción y fijación mayores a 1 hora disminuyen drásticamente los resultados tanto para IHQ cuanto FISH
- La muestra debe estar sumergida en fijador entre 10 y 72hs. Tanto la sub como la sobre fijación generan un aumento drástico de casos inconclusivos por falla en la técnica
- El fijador a utilizar debe ser FORMOL TAMPONADO NEUTRO AL 10%. No debe utilizarse Bouin's o fijadores con base en alcohol o Acido.
- En la medida de lo posible deben evitarse las tinciones ya que no siempre son completamente eliminadas en el proceso de aplicación de las técnicas moleculares y generan una alta autofluorescencia impidiendo la correcta visualización de las señales.

Protocolo de utilización

Desparafinado:

Pasos previos

- Preparar 1 recipiente (coplin) con Buffer de Desparafinado. Por lo menos 30 minutos antes de comenzar el proceso de desparafinado, colocar en un baño termostático a 90°C.

- Incubar los preparados conteniendo los cortes detejido a temperatura entre 45° y 60 °C durante 30 minutos.
- Sumergir los vidrios en Buffer de Desparafinado a 90°C durante 45 minutos.
- Enjuagar 2 veces en Etanol 100% 4 minutos cada vez.
- Dejar secar

Pretratamiento:

Pasos previos

- Preparar un recipiente (coplin) con Buffer de Pretratamiento. Colocar en un baño termostático a 71°C. Antes de utilizar corroborar que la temperatura interna de la solución sea de 71°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- Preparar un recipiente (coplin) con Solución de trabajo de Pepsina en un baño termostático a 37°C. Antes de utilizar corroborar que la temperatura interna de la solución sea de 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

- Incubar los preparados en Acido clorhídrico (HCl) 0.5N durante 20 minutos a T° ambiente
- Enjuagar 2 veces en Agua destilada 3 minutos.
- Sumergir los preparados en el Buffer de Pretratamiento a 81°C durante 60 minutos.
- Enjuagar 2 veces en Agua destilada 3 minutos.

- Dejar secar completamente
- Sumergir los preparados en la solución de Pepsina durante 4 a 10 minutos.
- Enjuagar la pepsina sumergiendo los preparados en H₂O destilada durante 3 minutos.
- Sumergir los preparados en 2XSSC a temperatura ambiente 15 minutos.
- Enjuagar brevemente en Agua destilada algunos segundos.
- Deshidratar en Etanol 70, 90 y 100% 2 minutos en cada uno.
- Dejar secar completamente.

Co-desnaturalización:

Preparación de la sonda:

- Descongelar la sonda, homogeneizar en Vórtex
- Centrifugar brevemente
- Atemperar el buffer de hibridación
- En un tubo de PCR agregar:
 - 7µl de Buffer de hibridación
 - 1µl de sonda
- Homogeneizar en Vórtex
- Centrifugar brevemente

Co-desnaturalización:

- Sobre el reverso del portaobjetos marcar la región a hibridar (los 8µl preparados hibridan una región aproximada de 22x22mm).
- Agregar la solución de sonda sobre la región marcada
- Colocar un cubreobjetos de tamaño adecuado
- Sellar los bordes del cubreobjetos con cemento de contacto removible
- Colocar el portaobjetos así montado sobre una superficie caliente (hibridador, plancha termostática, etc.). En ocasiones es conveniente colocar una gota de agua sobre la placa calefactora y luego colocar sobre ésta el portaobjetos montado, de esta forma se logra una película de agua entre el portaobjetos y la superficie caliente optimizando la transferencia de temperatura.
- Calentar a 78° - 85°C durante 5 minutos.
- Colocar en cámara húmeda, incubar a 37°C toda la noche.

Revelado

Pasos previos

- Por lo menos 30 minutos antes, calentar la solución de **enjuague 1** a 71°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) corroborando con un termómetro calibrado la temperatura dentro del recipiente.
- Atemperar la solución de **enjuague 2** a temperatura ambiente.
- Atemperar la solución de **contracolorante** previamente preparada (ver protocolo adjunto) a temperatura ambiente.

Enjuague del exceso de sonda

- Extraer el portaobjetos de la cámara húmeda.
- Quitar cuidadosamente el cemento de contacto.
- Sumergir el portaobjetos en una solución de 2XSSC a temperatura ambiente hasta que el cubreobjetos se desprenda (2 a 5 minutos).
- Sumergir el portaobjetos en el **enjuague 1** durante 2 minutos exactamente.
- Sumergir el portaobjetos en el **enjuague 2** un mínimo de 1 minuto.
- Drenar el exceso de líquido.
- Deshidratar en etanol 70, 90, 100% 1 minuto en cada uno.
- Dejar secar completamente
- Colocar sobre la región hibridada una gota (aprox. 10µl) de **contracolorante**.
- Agregar un cubreobjetos de tamaño mayor a la región hibridada.
- Drenar el exceso de **contracolorante** presionando suave y uniformemente con papel absorbente.
- Eliminar posibles burbujas de aire presionando suavemente con la punta de un tip.
- La reacción está lista para ser analizada.

Protocolo Resumido:

Paso	Tiempo
Desparafinado	
Incubación entre 45 - 60°C	30'
Buffer Desparafinado 90°	45'
Etanol 100% x2	4'
Dejar secar	///
Pretratamiento	
HCl 0.5N (T° ambiente)	20'
H2O destilada	2x3'
Buffer Pretratamiento 71°C	30'
H2O destilada	2x3'
Dejar secar completamente	///
Pepsina 0.5% 37°C	4-10'
H2O destilada	3'
2xSSC	15'
Etanol 70, 90, 100%	2' c/u
Dejar secar	///
Codesnaturalización-Hibridación	
Co-desnat 78° - 85°C	5'
Hibridación 37°C	Aprox. 18hs
Revelado	
Enjuague 1 71°C	2'
Enjuague 2 T° Amb	Mínimo 1'
Etanol 70, 90, 100%	1'
Dejar secar	
Montado con Sn. Montaje	///