



Protocolo para reacción de Hibridación in situ Fluorescente sobre espermatozoides humanos

Producto:

1. Sonda de DNA específico marcado con fluorocromo.
2. Buffer de Hibridación Especial para muestras de espermias
3. Reactivos para preparar Solución de Montaje (DAPI + Antifade)

Materiales extras requeridos:

- 2XSSC*
- Soluciones de etanol 70, 90 y 100%
- 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:
 - o 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.
 - o 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 objetivo de inmersión especial para fluorescencia con una apertura numérica $\geq 0,75$.
 - o 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 pedido específico o en diseños de ciertas sondas

- Micropipetas (1-10µl o similar)
- Microcentrífuga
- Vórtex
- Timer
- Baño de inmersión

- Incubadora 45°C)
- Placa termostática o hibridizador

Preparación de soluciones extras:

Solución Fisiológica: NaCl 0.9% (0.9gs. en 100ml. de agua destilada)

2XSSC:

Cloruro de Sodio (NaCl) 300mM

Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 30mM

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

Enjuague 1:

En un coplin adecuado para 80ml, agregar 16ml de 2XSSC, 64ml de agua bidestilada y 0,240 ml de detergente no-iónico.

Enjuague 2:

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

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.

FISH en espermatozoides

El kit ENESP está compuesto por las siguientes sondas:

- Vial 1: Enumeración 21 (verde) ● / Enumeración 13(naranja) ●
- Vial 2: Enumeración 18 (verde) ● / Enumeración X Y [naranja] ●

Fijado de la muestra:

1. Diluir el semen a procesar en 10ml Solución Fisiológica (CINa 0.9%)
2. Centrifugar 5 minutos a 3000rpm
3. Descartar el sobrenadante.
4. Repetir pasos 1-3 3 veces.
5. Resuspender en 1ml Solución Fisiológica
6. Agregar 50ul de fijador Carnoy (3:1 Metanol : Ácido Acético)
7. Centrifugar 5 minutos 3000rpm
8. Descartar el sobrenadante
9. Resuspender completamente en fijador Carnoy.
10. Mantener a -20°C
11. Gotear esta preparación en un portaobjetos limpio.
12. Dejar secar

Hibridación in situ Fluorescente (método de co-desnaturalización):

13. Preparar las sondas a utilizar:
Para cada set de sondas:
 - a. 7µl Buffer de Hibridación Especial
 - b. 1µl sonda
14. Agregar la sonda sobre la muestra tratada, colocar un cubreobjetos de tamaño adecuado y sellar con pegamento removible.
15. Colocar el portaobjetos así montado sobre una superficie caliente a 85°C durante 5 -12 minutos.
16. Incubar en cámara húmeda a 37°C toda la noche.
17. Transcurrido el tiempo de incubación extraer el portaobjetos de la cámara húmeda.
18. Quitar cuidadosamente el cemento de contacto
19. Sumergir el portaobjetos en una solución de 2XSSC a temperatura ambiente hasta que el cubreobjetos se desprenda (2 a 5 minutos).
20. Sumergir el portaobjetos en el **enjuague 1** (0.4XSSC + 0.3% detergente no iónico [Tween, NP40 o similar]) durante 2 minutos exactamente.
21. Sumergir el portaobjetos en el **enjuague 2** (2XSSC + 0.1% detergente no iónico [Tween, NP40 o similar]) un mínimo de 1 minuto.
22. Extraer el portaobjetos y drenar el exceso de líquido apoyando un extremo sobre papel secante.
23. Colocar sobre la región hibridada una gota (aprox. 10µl) de contracolorante.
24. Agregar un cubreobjetos de tamaño mayor a la región hibridada.
25. Drenar el exceso de contracolorante presionando suave y uniformemente con papel absorbente.

26. Eliminar posibles burbujas de aire presionando suavemente con la punta de un pip.
27. La reacción está lista para ser analizada.