

Príloha A: Protokoly k ISH

Príprava sondy

1 μg DNA som pridala do 16 μl redestilovanej vody, potom som pridala 4 μl DIG-Nick (Biotin-Nick) Translačnej zmesi (Roche, USA) a centrifugovala. Následne som nechala zmes inkubovať 90 min pri tep. 15°C. Reakciu som zastavila pridaním 1 μl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a zahriatím na 10 min na 65°C. Produkt som zliala do 1-2 skúmaviek, pridala som 1/10 z objemu vzorky 3 M octanu sodného (pH 5,2) a zamiešala. Pridala som 2 objemy (vzorky DNA) čistého alkoholu. DNA som nechala vyzrážať sa pri teplote -70 alebo -80°C polhodinu alebo dlhšie. Potom som zmes centrifugovala 30 min pri teplote -4°C rýchlosťou 14.000 rpm, vyliala som supernatant a zvyšky odstránila pipetou. Pelet som premyla 70 % etanolom, nechala odstáť 5-10 min, a znovu chvíľu centrifugovala pri 14.000 rpm. Vyliala som supernatant, odstránila zvyšky pipetou a vysušila DNA vo vákuu 5-10 min. DNA som rozpustila v TE, okolo 1/3 počiatočného objemu označovacej reakcie.

Takto pripravená sonda sa môže skladovať pri teplote -20°C dlhšiu dobu.

Príprava chromozómových roztlakov

Zber + fixácia

Najskôr som odobrala končeky mladých koreňov (ráno/doobeda medzi 11:00–13:00) a dala na 27–40 hod do ľadovej vody. Koriienky som následne fixovala v 3:1 (96 % etanol: kys. octová) 7 dní pri teplote 37°C.

- a. Pre okamžité použitie som koriienky farbila 2 hod v 1 % acetokarmíne a roztlačila (squashing)
- b. Na dlhšie uschovanie zamrazila pri -20°C a po uschovaní farbila v acetokarmíne 2 hod, (pre ďalšie uschovanie znovu zafixovala v 3:1 a zamrazila)

Squashing (roztlačenie)

Podložné sklíčko uložené najmenej dva dni v etanole som dôkladne vyleštila. Odstránila som koreňovú čiapočku z korienka, odrezala asi 1/2 mm meristému a roztlačila v kvapke 45 %-nej kyseliny octovej pokiaľ neboli viditeľné žiadne zvyšky pletiva. Sklíčko som mierne zohriala nad plameňom a potom preparát roztlačila pomocou krycieho sklíčka. Preparáty som následne zmrazila na suchom ľade. Odstránila som krycie sklíčko a ihneď vložila do 45 %-nej kyseliny octovej, ktorú som nechala pôsobiť pár sekúnd pri izbovej teplote. Potom som sklíčka preložila na 3 min do 45 %-nej kyseliny octovej s teplotou 50°C, vybrala ich a nechala voľne usušiť. Preparáty sú v tomto štádiu pripravené na okamžité použitie alebo sa môžu niekoľko dní skladovať v chladničke alebo dokonca pri izbovej teplote. Na dlhšie uschovanie je potrebné ich zamraziť pri -20°C v krabici na mikroskopické sklá.

Hybridizácia

Pripravila som (množstvá na 1 ml):

hybridizačný roztok I (stringencia 77 %), bez DNA

- Formamid (deionizovaný, bez nukleáz a proteináz) 500 µl
- redestilovaná voda 200 µl
- 50 % dextranzásobný roztok 50 %
(= 20 g na 40 ml roztoku/vody) 200 µl
- 20x SSC 100 µl

hybridizačný roztok II (stringencia 87 %), bez DNA

- Formamid (deionizovaný, bez nukleáz a proteináz) 500 µl
- redestilovaná voda 275 µl
- 50 % dextranzásobný roztok 50 %
(= 20 g na 40 ml roztoku/vody) 200 µl

- 20x SSC 25 μ l

hybridizačný roztok III (stringencia 98 %), bez DNA

- Formamid (deionizovaný, bez nukleáz a proteínáz) 500 μ l
- redestilovaná voda 295 μ l
- 50 % dextranzásobný roztok 50 %
(= 20 g na 40 ml roztoku/vody) 200 μ l
- 20x SSC 5 μ l

Pripravila som veľké množstvo týchto hybridizačných roztokov a skladovala zmrazené pri -20°C . Podľa potreby sa môže pridať DNA alebo pripraviť úplnú hybridizačnú zmes s DNA a niekoľko mesiacov sa môže skladovať zmrazená.

Pripravila som 20 μ l* hybridizačnej zmesi:

- hybridizačný roztok 16 μ l
- DNA sonda I 1 μ l
- DNA sonda II 1 μ l
- Redestilovaná voda 2 μ l

*Dostatočné množstvo pre preparát prekrytý krycím sklíčkom 22×40 mm

FISH

Prvý deň:

Skôr ako som začala pracovať, nastavila som inkubátor na 37°C a termocycler na 80°C . Na preparát s roztlakmi chromozómov som napipetovala 20 μ l hybridizačnej zmesi a prekryla krycím sklíčkom 22×40 mm. Sklá som na termocycleri zahrievala na 80°C počas 2 min 30 s (denaturácia), následne som ich

rýchlo preniesla do vlhkej komôrky (SM 30, Boekel Scientific, USA). V nej som ich nechala inkubovať cez noc pri 37°C (max 16 h) – *in situ* hybridizácia.

Druhý deň:

Po hybridizácii som najskôr zmyla krycie sklíčko destilovanou vodou (stričkou), potom som sklá ponorila na 10 min do 2x SSC (aby sa odstránil dextran). Následne som sklá premyla destilovanou vodou a usušila. Na každé sklíčko som napipetovala 30 µl detekčného roztoku, ktorý obsahuje 1,5 µl anti-DIG FITC (1:200; 200 µg/ml, Roche, USA) a 3 µl Cy3-Streptavidínu (1:100; 1 µg/ml, Sigma Aldrich, USA) v 1x blokujúcom reaktante (Vector Laboratories, USA) a prikryla krycím sklíčkom. Následne som nechala sklá inkubovať 1-2 hodiny pri 37°C. Po inkubácii som pod prúdom vody zmyla krycie sklíčko, premyla destilovanou vodou, usušila, a pridala 12 µl uzatváracieho média Vectashield (Vector Laboratories, USA). V tomto stave boli preparáty pripravené na pozorovanie pod fluorescenčným mikroskopom.