



Laboratório de Citogenética Vegetal - UFPE

Protocolo de Hibridização *in situ* fluorescente

(modificado de Pedrosa *et al.*, 2002. Genetics 161: 1661–1672)

Versão 1.0 (09/12/2019)

I – Pré-tratamento das lâminas

(Opcional para lâminas armazenadas no freezer:

- Fixe as lâminas em Carnoy por 15 min
- Desidrate em série alcoólica: 3 min em etanol 70% e 3 min em etanol 100%)
- Incube as lâminas a 60 °C por 30 min
- Deixe as lâminas esfriarem por 5-10 min na bancada
- RNase:
 - Incube as lâminas com 50 µl de solução de RNase por 1h a 37 °C em câmara úmida pré-aquecida
 - ✓ Solução estoque de RNase (4 °C): 20 mg/ml de RNase (Invitrogen)
 - ✓ Solução de RNase para uso: 100 µg/ml em 2x SSC (diluição 1:200) – 0,25µl de RNase + 49,75µl de 2x SSC por lâmina
- Lave as lâminas 3 x 5 min em 2x SSC
- Pepsina:
 - Incube as lâminas com 100 µl de solução de pepsina por 20 min a 37 °C em câmara úmida pré-aquecida
 - ✓ Solução estoque de pepsina (-20 °C): 1mg/ml em H₂O miliQ
 - ✓ Solução de pepsina para uso: 10 µg/ml em 0,01N HCl (diluição 1:100) – 1µl de pepsina + 99µl de 0,01N HCl por lâmina
- Lave as lâminas 3 x 5 min em 2x SSC
- Formaldeído:
 - Incube as lâminas em Koplín com solução de formaldeído por 10 min a TA
 - ✓ Solução estoque de formaldeído (TA): Formaldeído 37% (Merck)
 - ✓ Solução de formaldeído para uso: 3,7% formaldeído em 1x PBS (diluição 1:10: 56 ml de dH₂O + 7 ml 10x PBS + 7 ml de estoque 37% = 70 ml)
 - ✓ Sugestão: caso tenha poucas lâminas pode-se utilizar 50µl por lâmina (5µl de formaldeído 37% + 5µl de 10x PBS + 40µl de água dH₂O), cobrindo com lamínula plástica
- Lave as lâminas 3 x 5 min em 2x SSC
- Desidrate em série alcoólica: 3 min em etanol 70% e 3 min em etanol 100%

- Seque as lâminas por 1 h (no mínimo 30 min)

II – Hibridização

- Prepare a **mistura de hibridização (76% de estringência)** mantida no gelo:

Reagentes	Concentração inicial	Volume	Concentração final	Concentração final para 40% estringência
Formamida	100%	5 μ L	50%	-
Dextrano Sulfato	50%	2 μ L	10%	10%
SSC	20x	1 μ L	2x	6x
DNA bloqueador	5 μ g/ μ L	0-1 μ L	0-500ng/ μ L	-
Sonda	50ng/ μ L	1-2 μ L	5-10ng/ μ L	5-10ng/ μ L
dH ₂ O		p/ total 10 μ L por lâmina		

- Dê um vórtex na **mistura de hibridização** por no mínimo 10 s
- Aqueça a mistura de hibridização a 75 °C 10 min e transfira para gelo por pelo menos 5 min
- Dê um spin e coloque 10 μ l da mistura de hibridização por lâmina, cubra com lamínula de vidro
- Desnature as lâminas com a mistura de hibridização a 75 °C por 5 min (se necessário, ajuste tempo e temperatura para melhor preservação da estrutura cromossômica)
- Vede com cola plástica e incube em câmara úmida pré-aquecida a 37 °C de 14h até 3 dias

III – Banhos pós-hibridização

- Retire a cola plástica com a pinça e mergulhe as lâminas em 2x SSC TA, por pelo menos 5 min, até caírem as lamínulas

Lavagem convencional (72% de estringência):

- Incube 2 x em 2x SSC, 42°C, por 5 min
- Incube 2 x em 0,1x SSC, 42°C, por 5 min
- Incube em 2x SSC, 42°C, por 5 min
- Transfira para 2x SSC, TA, por 10 min

Lavagem para estringência reduzida (40% de estringência):

- Incube as lâminas 6 vezes em 6x SSC a temperatura ambiente por 5 min
- **p/ marcação direta:** monte em 8 µl de DAPI/Vectashield ou DAPI/Meio de montagem (para DNAr) e vede com esmalte
- **p/ marcação indireta:** continue com o item **IV Detecção**

IV – Detecção (para sondas marcadas indiretamente)

- Aplique 100 µl 3% BSA/1x PBS por lâmina, cubra com parafilme e incube a 37 °C, 30 min

Anticorpos primários:

0,4 µl de *sheepanti-digoxigenin* conjugado com FITC (Roche, 1 207 741)

19,6 µl de solução bloqueadora (BSA 3%/1x PBS)

20 µl total por lâmina

- Remova o parafilme e excesso de líquido, aplique 20 µl da solução de anticorpo por lâmina, cubra com parafilme e incube a 37 °C em câmara úmida por 1 h
- Remova o parafilme e lave 3 vezes em 1x PBS/0,1% Tween 20 por 5 min cada

Anticorpos secundários:

0,2 µL de *donkeyanti-sheep* conjugado com FITC (Serotec Star88F)

19,8 µL de solução bloqueadora (BSA 3%)

20 µL total por lâmina

- Aplique 20 µl de anticorpo secundário, cubra com parafilme e incube a 37 °C em câmara úmida por 1 h
- Remova o parafilme e lave 3 vezes em 1x PBS/0,1% Tween 20 por 5 min cada
- Monte em 8 µl de DAPI/Vectashield ou DAPI/Meio de montagem e vede com esmalte.

V – Rehibridização de lâminas

- Remova o esmalte e lave a lâmina em 4x SSC/0,1% Tween 20 até cair a lamínula
- Lave a lâmina 3 vezes em 4x SSC/0,1% Tween 20 por 30 min a 1 h
- Lave as lâminas 2 vezes em 2x SSC por 5 min
- Desidrate em série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 5 min em etanol 100%
- Seque as lâminas por 1 h (no mínimo 30 min)
- Continue no item **II – Hibridização**

VI – Deshibridização de lâminas para remoção de sondas repetitivas e posterior rehibridização

- Prepare a mistura de hibridização (76% de estringência), sem adicionar sondas
- Dê um vórtex na mistura de hibridização por no mínimo 10 s
- Dê um spin e coloque 10 µl da mistura de hibridização por lâmina, cubra com lamínula de vidro
- Desnature as lâminas com a mistura de hibridização a 75 °C por 5 min (se necessário, ajuste tempo e temperatura para melhor preservação da estrutura cromossômica)
- Lave as lâminas 2 vezes em 2× SSC por 5 min
- Desidrate em série alcoólica: 5 min em etanol 70% e 5 min em etanol 100%
- Seque as lâminas por 1 h (no mínimo 30 min)
- Continue no item **II – Hibridização**