

# FISH

## *Fluorescens in situ* hibridizáció

(Amann et al. 1990, Manz et al. 1992)

**FISH módszer kidolgozása talaj mikroorganizmusok vizsgálatára, különös tekintettel szerves szennyezőanyagok degradációjára képes mikroorganizmusok valamint nehézfém-tűrő mikrobák detektálására, mennyiségi és minőségi meghatározására.**

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció lehetővé teszi a baktériumok gyors és pontos minőségi és mennyiségi meghatározását természetes környezetükben. A mikroszkópos analízis legfontosabb előnye a többi molekuláris biológiai technikával szemben, hogy információt ad a mikroorganizmusok morfológiai jellemzőiről, szerkezetéről, számáról, térbeli elhelyezkedéséről. A módszer elve, hogy a fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotid próba a sejt morfológiájának változtatása nélkül bejut a sejtbe, ahol specifikusan köt a komplementer target szekvenciához. Ezután a jelölt oligonukleotid próba hibridizációja mikroszkóppal vizsgálható. Abban az esetben, ha az emittált fény eltérő hullámhosszúságú, egyszerre több, különböző festékkel jelölt oligonukleotid próba hibridizációja is detektálható.

A módszer lépései a következők:

1. A minta fixálása
2. Hibridizáció
3. A nem hibridizált próbák eltávolítása mosással
4. Minták értékelése mikroszkóppal, dokumentáció

### 1) Tárgylemez előkészítése

A tárgylemezeket 1 órára 90% Etanol, 10% szilárd KOH elegyébe tesszük, hogy a zsírt leoldjuk róla, majd szárítás után zselatinbevonatot képezünk rajtuk.

A zselatinbevonathoz 300 ml 70°C-os desztillált vízben feloldunk 0,225 g zselatint. Ha teljesen feloldódott beoldunk 0,03 g Kálium-króm-szulfátot (12 kristályvizet tartalmaz).

Az elkészült oldatba a tiszta tárgylemezeket belemártogatjuk, majd sterilboxban légáram alatt szárítjuk, hogy a felületére ne ragadjon por, v. egyéb szennyeződés.

#### 0,075%-os zselatin:

300 ml desztillált víz

0,225 g zselatin

0,03 g  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

## 2) Sejtek fixálása

A hibridizáció előtt szükség van a mikroorganizmusok fixálására a sejt átjárhatóvá tételére a fluoreszcens próbák számára, a sejt épségének fenntartására, valamint az RNS-ek védelmére, lebomlásuk megakadályozására. Fixálni lehet a mikrobákat kicsapószerrel, mint pl. etanollal, metanollal vagy keresztköteket létrehozó ágensekkel, pl. aldehidekkel. Gram-negatív baktériumok vizsgálata esetén általában 3-4 v/v%-os formaldehid vagy paraformaldehid megfelelő fixálást biztosít, míg Gram-pozitív baktériumok meghatározásához etanol (50%), etanol/formalin, (9:1v/v) vagy hőkezelés valamint további, permeabilitást növelő lépés szükséges (Roller et al., 1994).

- **Sejtszuszpenzió mosása**

Egy 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe nem túl öreg (1-4 napos) sejtszuszpenzióból 20/50/100 µl-t pipetázunk, hozzáadunk 200 µl 1×PBS-t, majd 5 percig 4500-as fordulatszámon centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, felvesszük a sejteket újabb 200 µl 1×PBS-ben és centrifugáljuk.

**a) Paraformaldehiddel történő (PFA) fixálás (G – sejtek meghatározására)**

- **4% PFA készítése**

Erlenmeyer-lombikba 33 ml steril desztillált vizet mérünk, majd 60-70°C-ra melegítjük fel. Belemérjük a 2 g paraformaldehidet, és hozzáadunk 30-40 µl 10M NaOH-ot.

Ha feloldódott a paraformaldehid, hozzáadjuk a steril 3×PBS-t, ha szükséges a pH-t 20°C-on 7,2-7,4 közé állítjuk be HCl-lel.

4%-os PFA:

33 ml steril desztillált víz  
2 g paraformaldehid  
30-40 µl steril 10M NaOH  
16,5 ml steril 3×PBS  
pH=7,2 - 7,4 (HCl)

1×PBS (Phosphate-buffered saline):

8 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1000 ml desztillált víz  
pH=7,4 (HCl)

- **Fixálás**

Még egyszer mossuk 200 µl 1×PBS-sel, majd centrifugálás és a felülúszó leöntése után a sejteket felvesszük 200 µl 1×PBS-ben és 600 µl PFA-ban. 3 órán át szobahőmérsékleten, vagy egy éjszakán át 4°C-on hűtőszekrényben hagyjuk állni.

**b) Etanolos fixálás (G + sejtek meghatározására)**

A sejteket felvesszük 200 µl 1×PBS-ben és 200 µl 0 °C-os absz. etil-alkoholban és állni hagyjuk kb. 5 percig.

### 3) Hibridizáció

A vizsgálni kívánt RNS-sel komplementer fluoreszcens jelöléssel ellátott próbát előmelegített hibridizációs pufferben kell nagyon pontosan meghatározott körülmények között a mintához adni. A legfontosabb hibridizációt befolyásoló körülmények a formamid koncentrációja és a hibridizáció hőmérséklete. Formamid adagolásának hatására a hidrogén-hidak gyengítése révén csökken a nukleinsav olvadáspontja. Alacsonyabb hőmérsékleten nagy pontossággal megy végbe a hibridizáció.

- **Sejtszuszpenzió rögzítése**

A fixált sejtszuszpenziót lecentrifugáljuk, a felülúszót leöntjük, majd a sejteket felvesszük 200 µl 1×PBS-ben. Vortexelés után a sejteket újra lecentrifugáljuk, majd 200 µl 1×PBS-ben felvesszük. Az előkészített tárgylemez hátoldalára kb. 1 cm átmérőjű kört rajzolunk, oda cseppentünk 10 µl-t a sejtekből. 46°C-os termosztátban 10 percig szárítjuk.

- **Hibridpuffer készítése**

Elkészítjük a hibridizációhoz szükséges formamidos puffert. 2 ml-es eppendorf-csőbe bemérünk 360 • 1 5M NaCl-ot, 40 • 1 1M Tris/HCl-t, 700 µl 35%-os formamidot, 900 µl steril desztillált vizet és 4 • 1 10%-os SDS-t ebben a sorrendben.

Hibridizációs puffer:

360 • 1 5M NaCl  
40 • 1 1M Tris/HCl (pH=8,0)  
700 µl formamid  
900 µl steril desztillált víz  
4 • 1 10%-os SDS

1M Tris/HCl, pH=8,0

121,1 g Tris  
800 ml desztillált víz  
42 ml koncentrált HCl  
feltölteni 1000 ml-re  
pH-t ellenőrizni

10%-os SDS

100 g SDS (Nátrium lauryl szulfát)  
900 ml H<sub>2</sub>O  
68°C-on feloldjuk  
pH=7,2 (néhány csepp cc.HCl)  
feltölteni 1000 ml-re

- **Sejtek dehidratációja**

A minta rögzítését követi a sejtek dehidratációja 50, 80 és 100 %-os etanolban, 3-3 percen keresztül. Az egyes oldatok között megszáritjuk a tárgylemezeket. Ezalatt felolvasztjuk az oligonukleotid-próbát (EUB338).

- **Hibridizáció**

A rögzített és dehidratált mintához, a sejtek érintése nélkül 10 • 1 hibridizációs puffert és abban elosztatva 1 • 1 (30 ng/• 1 Cy3 festékkel jelölt) oligonukleotid próbát pipetázunk. A tárgylemezt Falcon csőbe helyezve 46°C-on 1,5 órán át inkubáljuk. A megfelelő nedvességtartalmat a szintén a Falcon csőbe helyezett a hibridizációs puffer maradékával megnedvesített papírvattával biztosítjuk.

- **Mosópuffer elkészítése**

Tárgylemezenként a következő pufferoldatot állítjuk össze 50 ml-es Falcon-csőben:

Mosópuffer:

1 ml Tris/HCl (pH=8,0)  
700 µl 5M NaCl  
500 µl 0,5M EDTA  
50 µl 10%-os SDS  
desztillált vízzel kiegészíteni 50 ml-re

0,5M EDTA (Ethylendiamine-tetraacetate.2H<sub>2</sub>O)

186,12 g EDTA  
800 ml desztillált víz  
kb. 20 g silárd NaOH a pH állításhoz  
pH=8,0 (csak itt oldódik)

- **Mosás**

A hibridizáció ideje alatt elkészített, és 48°C-ra felmelegített mosó puffer kis részével leöblítjük a sejteket, majd a maradékot Falcon-csőbe töltjük és beleállítva a tárgylemezt 10 percig 48°C-os vízfürdőben inkubáljuk. A mosó puffert jéghideg csapvízzel távolítjuk el, majd szárítjuk.

## DAPI festés

Az alkalmazott univerzális DNS-hez kötődő fluoreszcens festék a (DAPI) 4',6-diamidino-2-fenilindol (Merck).

A tárgylemezen rögzített sejtekre 20 • l 0.1 • g/ml DAPI oldatot pipettáztunk, 10 perc 25°C-on sötétben történő inkubálás után PBS pufferrel majd ultra tiszta vízzel (MQ) mostuk a sejteket. A DAPI-val festett sejteket DAPI (Nikon, Japan) filterrel vizsgáltuk.

## Mikroszkópos vizsgálat

A FISH preparátumot a fényérzékeny festék fluoreszcens fényének fakulását gátló anyaggal, Citifluorral (Citifluor Ltd., London, UK) vonjuk be, majd mikroszkóppal vizsgáljuk a mintát.

A preparátumokat Episcopic Fluorescent Attachment V-FM-feltéttel ellátott Nikon Eclipse E400-as mikroszkóppal vizsgáljuk. Az UV fényforrást nagynyomású Hg-gőzlámpa biztosítja (Nikon, Japan). A hibridizációs próba jelét a G2-A (EX 510-560nm, DM 575nm, BA 590nm) szűrő segítségével, a DAPI által jelzett sejteket a DAPI szűrővel (EX 340-380, DM 400, BA 435-485) detektáljuk 40x Plan Fluor (Nikon, Japan) és 100x Plan Fluor (Nikon Japan) objektívekkel. A képeket SPOT INSIGHT Color (Diagnostic Instruments Inc., Michigan, USA) kamerával készítjük és a kamerához tartozó szoftverrel értékeljük.