

Hibridación In Situ en secciones gruesas de vibratomo

(Vicente Herranz Pérez, Unitat de Genetica Molecular, IBV)

(Se va trabajar con ARN, por lo que se ha de ser muy estricto y cuidadoso para evitar las RNAsas, siempre se utilizará material tratado, soluciones tratadas con depc-inhibidor de nucleasas- y siempre se utilizarán guantes)

➤ Se anestesiara el animal con Hidrato de Cloral 70 mg/ml, inyección intraperitoneal de un volumen (medido en μ l) igual a 7 veces el peso (medido en g).

➤ Se extrae el cerebro lo más rápido posible; se lava con PBS-depc a 4 °C y una vez sacado se fija o/n a 4 °C en paraformaldehido 4 % en PBS-depc en agitación.

(para un cerebro es suficiente con 50 ml de paraformaldehido, se disuelven 2 g de paraformaldehido en 50 ml de PBS-depc a 65 °C y se le va dando vortex para acelerar la disolución)

➤ Se lava el tejido en PBS-depc a 4 °C durante 30 min en agitación.

➤ Se incluye el tejido, la inclusión se realizara en gelatina, para esto se utilizarán 2 ml de gelatina y 160 μ l de glutaraldehido al 25% (se ha de hacer lo más rápido posible para que no solidifique la gelatina). Se deja unos 30 min a 4 °C.

➤ Corte del tejido:

Previo al corte se rocía con etanol toda la zona de trabajo incluido el vibratomo, se tratará la camarita para el corte con NaOH 0.5 N durante 30 min y las cuchillas se tratan durante 10 min con etanol y 10 min en acetona; se lava con H₂O MQ.

Se pega el bloque de gelatina a la camarita con cianocrilato (Superglu) y se procede al corte. Este se realizara en PBS-depc a 4 °C y siempre con precaución que esté la camarita a 4 °C. Las rodajas se van depositando en paraformaldehido al 4% en PBS-depc.

- Se lavan los cortes 2 veces con PBTW (Tween 20 al 0.1% en PBS) a 4 °C durante 5 min en agitador orbital.
- Deshidratación con metanol en PBTW : 25%, 50%, 75%, y 2 veces en 100%; 5 min cada paso a 4 °C en agitador orbital.
- Rehidratación con metanol en PBTW: 75%, 50%, 25% 5 min cada paso a 4 °C en agitador orbital.
- 5 min en PBTW a 4 °C en agitador orbital.
- Se blanquean las secciones :10 min en PBTW con 1% de H₂O₂ a 4 °C en agitador orbital.
- 3 lavados de 5 min en PBTW a 4°C en agitador orbital.
- Se tratan las rodajas con 5 mg/ml de proteinasa K en PBTW, a temperatura ambiente durante 7 min en agitador orbital.
- Lavar con PBTW durante 5 min, 3 veces, a 4 °C en agitador orbital.
- Se realiza una postfijación con paraformaldehído al 4% en PBTW, durante 20 min a 4 °C en agitador orbital. (primero se disuelve el paraformaldehído en PBS-depc y una vez disuelto y frío se le añade el Tween 20)
- Dos lavados de 5 min en PBTW a 4 °C en agitador orbital.
- Se transfieren las rodajas a placa de menor volumen con PBTW, se retira el PBTW y se les añade 350 µl de solución de prehibridación (o un volumen suficiente para que cubra las rodajas).

- Se sustituye por 1 ml de solución de prehibridación fresca y se incuba a 57 °C en agitación. El tiempo de prehibridación puede variar según las necesidades del experimento entre 2-16 horas.

- Precalentar la Sol. de hibridación que se vaya a usar a 65 °C, se le añade la sonda y una vez mezclada se deja 5-10 min a 65 °C (la concentración de sonda a usar depende del experimento, nosotros utilizaremos sonda antisense de TH marcada con digoxigenina a 1µg/ml)
- Se retira la Sol. de prehibridación y se le añade la sonda esto se realizará sobre un termobloque a 65 °C para que no descienda la temperatura, y se incuba o/n a 57 °C en movimiento.

- Lavados de la sonda (se harán con soluciones precalentadas a 65 °C):
 - 2 lavados de 5 min con 2x SSC, 0,1% CHAPS en MQ-depc
 - 3 lavados de 30 min con 2x SSC, 0,1% CHAPS en MQ-depc
 - 4 lavados de 20 min con 0.2x SSC, 0,1% CHAPS en MQ-depc

- 3 lavados de 5 min a temperatura ambiente con KTBT

- Bloqueo con 20% de FCS + 0,7% polvo bloqueante en KTBT a 4 °C 3 horas como mínimo en agitador orbital.

(El polvo bloqueante se disuelve en KTBT a 65 °C vortexando frecuentemente, una vez disuelto y frío se le añade el FCS. El polvo bloqueante tarda en disolverse por lo que es conveniente comenzar a prepararlo con antelación.)

- Preabsorción del anticuerpo:

En un eppendorf se ponen 3mg de polvo de cerebro y 1ml de KTBT, se incuba 30 min a 70 °C y se va machacando con un micropistilo cada 10 min.

Se enfria a 4 °C y se le añade todo el Ab anti-Dig que se vaya a usar (El Ab anti-Dig se utilizará a una concentración 1:1000 en Sol. de polvo bloqueante). Se deja preabsorber 1h a 4 °C en movimiento. Centrifugar a 4 °C a velocidad máxima 5 min. Tomar el sobrenadante y diluirlo en Sol. bloqueante hasta tener la dilución deseada (1:1000).
- Se incuban las rodajas con el Ab en Sol. bloqueante o/n a 4 °C en agitador orbital.
- Lavar las secciones durante 5 horas al menos 1 vez cada hora en KTBT a temperatura ambiente.
- 3 lavados de 15 min en NTMT 1mM levamisol a temperatura ambiente.
- Se transfieren las rodajas a pocillos de vidrio.
- Preparar la sol de revelado en tubos protegidos de la luz: NTMT 1mM de levamisol al que se le añaden los cromógenos: 3 µl NBT/ml y 2,3 µl BCIP/ ml y se mezcla.
- Se le añade la sol de revelado y se deja en movimiento (rocker) en oscuridad vigilando la reacción; cuando se observe una señal potente parar la reacción lavando varias veces con KTBT.
- Una vez lavadas se pasan las rodajas a PBS 4 °C y si se va a tardar mucho tiempo en montar a PBS conteniendo 0,02% de azida de sodio.

Montaje: Con un pincel se deposita suavemente la sección sobre el portaobjetos, se seca con cuidado con un pincel acrílico, y una vez seca a cada sección se cubre con una gota de 50% de glicerol + 0.02% azida en PBS. Se deja reposar unos 10 min y se le coloca el cubreobjetos con suavidad. Se deja reposar un par de días y se fija el cubreobjetos al portaobjetos con laca de uñas.

Preparación de la Sonda

Se preparará una mezcla, con todo lo necesario para la sintetizar la sonda y a esta se le añadirá el plásmido linearizado. Es conveniente que todo se mantenga en hielo mientras se pipetea.

8,5 μ l H₂O Nuclease free

4 μ l 5x transcription Buffer

2 μ l 0,1M DTT

2 μ l de la mezcla de nucleótidos (nosotros utilizamos el UTP-digoxigenina, de Roche)

1,5 μ l del plásmido linearizado (1 μ g/ μ l)

0,5 μ l de RNAsa INH (100 unidades/ μ l)

1 μ l de RNA polimerasa

Se incuba todo 2 horas a 37° C

Precipitar con 2 μ l de acetato sódico 3 M y 40 μ l de etanol 100%

Se mezcla y se deja 30 min a -80°C o o/n a -20°C

Centrifugar 30 min a V_{máx} 4°C. Eliminar sobrenadante

Lavar con 200 μ l de Etanol 70%

Centrifugar 30 min a V_{máx} 4°C. Eliminar sobrenadante

Se deja secar el pellet, alternando el tubo entre hielo y r.t. para que no aumente mucho la temperatura, y se resuspende en 12,5 μ l de H₂O Nuclease free.

Corremos 1 μ l en gel de agarosa 1% TBE para ver la cantidad sintetizada.

Al resto (11,5 μ l) se le añade 11,5 μ l de formamida

Preparación polvo de Cerebro

Homogenizar varios cerebros en el mínimo volumen de PBS

Añadir 4 volúmenes de acetona a 4° C. Mezclar e incubar a 4°C 30 min.

Centrifugar 10000 g 10 min. Desechar el sobrenadante.

Lavar el pellet con acetona y centrifugar otra vez.

Machacar el pellet hasta que se convierta en un polvo fino. Secar al aire y guardar protegido del aire (eppendorf con parafilm) a 4°C.

Soluciones:

PBS: 8g NaCl+ 0,2g KCL+ 1,44 g Na₂ HPO₄ + 0,24 g KH₂PO₄ en 1l de H₂O ajustar a pH 7,4 con HCL

PBTW: PBS con Tween 20 al 0,1%

Solución de Prehibridación: 50% Formamida desionizada; 5X SSC; 2% blocking powder; 0.1% Triton X-100, 1mg/ml *Torula* RNA; 5mM EDTA; 50 µg/ml heparina

SSC 20x: 175,3 g NaCl + 88,2 g Citrato Sódico en 1l de H₂O. Ajustar a pH 7,0 con NaOH 10 N

KTBT: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM KCl; 0,3% Triton X-100

NTMT: 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 50 mM MgCl₂ ; 100 mM NaCl; 0,1% Tween 20.

NBT solución stock: 75 mg/ml NBT en dimetilformamida al 70%.

BCIP solución stock: 50 mg/ml BCIP en dimetilformamida.

Tratamiento del Material:

El material de vidrio y metal se rocía con etanol se envuelve en papel de aluminio y se hornea 2 h a 200 °C

El material que no permite este horneado (plastico, metacrilato, etc.) se trata 40 min con NaOH 0.5 N y luego se lava con MQ

Las soluciones salinas y el PBS han de ir tratados con depc (dietil pirocarbonato) 1:10⁴, tras añadirle el depc se incuban o/n a 37 °C y se autoclavan posteriormente para inactivar el depc.

Bibliografía

Nieto M.A., Patel K., Wilkinson D.G. In Situ Hybridation Analysis of Chick Embryos in Whole Mount and Tissue Sections. Methods in Cell Biology. 1996. Vol 51, 219-235.

Wilkinson D.G. In Situ Hybridization: a practical approach. 1998. 2ª edición. Oxford University Press.

Toledo-Aral JJ, Mendez-Ferrer S, Pardal R, Echevarria M, Lopez-Barneo J. Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. J Neurosci. 2003 Jan 1;23(1):141-8.