

Hibridização genômica *in situ* em Triticeae: um enfoque metodológico

Sandra Patussi Brammer¹
Liane Balvedi Poersch²
Ana Rafaela de Oliveira³
Santelmo Vasconcelos⁴
Ana Christina Brasileiro-Vidal⁵

Introdução

Em muitos gêneros, especialmente nos que fazem parte de um complexo poliplóide, como é o caso de *Triticum*, as espécies relacionadas fornecem uma importante reserva de genes. Em Triticeae, a ampla hibridação entre espécies relacionadas representa um potencial prático no melhoramento genético, provavelmente muito maior do que em outros grupos, em função da facilidade de cruzamento e do grande conhecimento de seus genomas (MUJJEBAKAZI & KIMBER, 1985). Nos programas de melhoramento, os híbridos e seus derivados são, em geral, analisados por diferentes formas, a fim de se conhecer melhor a sua constituição tanto fenotípica quanto genética, visando à disponibilização e uso posterior desses germoplasma.

A hibridização *in situ* fluorescente, comumente chamada por FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization), consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA (ácido desoxirribonucléico) ou RNA (ácido ribonucléico) com uma sequência específica de nucleotídeos complementares. Sua principal finalidade é verificar se a célula possui essa sequência e qual a sua exata localização no cromossomo (GUERRA, 2004). Baseia-se no fato do DNA ser formado por duas fitas

complementares, as quais podem ser facilmente desnaturadas e posteriormente renaturadas, voltando ao estado de fita dupla. O desenvolvimento da técnica de FISH tem possibilitado a identificação de sequências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em núcleos interfásicos e em fibras de cromatina distendidas. Essa técnica envolve a preparação de lâminas, o isolamento e a marcação da sequência de DNA que se deseja localizar *in situ* e a sua hibridização nos cromossomos. O DNA marcado funciona como uma sonda para encontrar as sequências do DNA cromossomal complementar a ela, chamada de DNA alvo. Para visualizar as regiões hibridizadas com a sonda, é preciso associar um corante fluorescente (fluorocromo) à sonda e outro ao restante dos cromossomos (BRASILEIRO-VIDAL & GUERRA, 2002).

A detecção de sequências *in situ* tem gerado avanços importantes na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos, a investigação detalhada da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introgridida em cruzamentos interespecíficos, a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas, além da verificação da posição de genes e de marcadores moleculares, que tem sido muito útil

¹ Pesquisadora Embrapa Trigo – área de Citogenética e Genética Molecular. BR 285, Km 294, Passo Fundo, RS. sandra@cnpt.embrapa.br.

² Bióloga. Mestranda em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. lianebpoersch@yahoo.com.br.

³ Bióloga. Bolsista DTI, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE. oliveira_ars@yahoo.com.br.

⁴ Biólogo. Mestrando em Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE. santelmovasconcelos@gmail.com.

⁵ Professora do Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE. brasileiro_vidal@hotmail.com.

na integração de mapas genéticos e cromossômicos.

A técnica de hibridização genômica *in situ* (GISH)

Quando se pretende distinguir cromossomos de diferentes parentais ou de genomas distintos, oriundos de híbridos interespecíficos ou de alopoliplóides, usando sonda de DNA genômico, a FISH é denominada hibridização genômica *in situ* (Genomic *In Situ* Hybridization – GISH). Neste caso, utiliza-se como sonda o DNA genômico total de um parental envolvido na formação de uma espécie de origem híbrida (MUKAY, 2005). Por outro lado, o DNA do segundo parental deve ser bloqueado, a fim de evitar hibridização de sequências comuns a ambos os genomas. Para isso, devem ser utilizados, em conjunto na GISH, a sonda do DNA genômico a ser localizado *in situ* e o DNA não marcado do genoma que se deseja bloquear. A proporção sonda:DNA bloqueio deve ser suficiente para evitar a marcação de cromossomos do segundo parental (ver Fig. 1).

A marcação de sondas pode ser direta ou indireta (Fig. 1A). Na marcação direta, os nucleotídeos marcados utilizados no processo estão associados a fluorocromos, os quais podem ser visualizados diretamente em microscópio de fluorescência utilizando um filtro adequado, após hibridização *in situ*. Por outro lado, na marcação indireta, os nucleotídeos marcados estão associados a moléculas marcadoras (Fig. 1A). Estas não podem ser visualizadas em microscopia. Por essa razão, após hibridização *in situ*, as sondas marcadas indiretamente devem passar por uma etapa de detecção (Fig. 1H). Nesta etapa, as moléculas marcadoras são reconhecidas por anticorpos conjugados a fluorocromos, permitindo que a sonda seja então visualizada (Fig. 1J). Para maiores detalhes, ver Guerra (2004).

A GISH tem aplicações no entendimento da evolução, na caracterização de genomas e cromossomos em híbridos poliplóides, alopoliplóides parciais e linhagens recombinantes, bem como na detecção e monitoramento da quantidade de cromatina introgridida na produção de novas linhagens (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2005; CHEN

et al., 2005; JAHIER et al., 2009). Assim, a GISH tem contribuído de forma eficiente para a análise da estabilidade cariotípica dos materiais estudados bem como para a caracterização e escolha dos melhores genótipos, atuando na seleção assistida em diferentes fases do melhoramento genético.

A seguir, serão descritas as principais etapas metodológicas usadas no processo de GISH, utilizando, como modelo, híbridos entre trigo comum ($2n = 6x = 42$ cromossomos, genomas AABBDD) e centeio ($2n = 2x = 14$, RR), triticales octoplóides ($2n = 8x = 56$, AABBDDRR), hexaplóides ($2n = 6x = 42$, AABBRR) e seus derivados. Para exemplificar a análise dos triticales e de seus derivados, o DNA de centeio será considerado para marcação e utilização como sonda e o DNA de trigo será aquele não marcado e usado como bloqueio, em uma proporção sonda:bloqueio de 1:10. Variações da técnica para outras Triticeae serão discutidas.

Principais etapas metodológicas

1. Extração de DNA (sonda e bloqueio)

Em uma GISH, a extração do DNA genômico das plantas é o primeiro passo para posterior produção de sonda e DNA bloqueio, sendo dessa forma uma etapa muito importante, visto que o DNA deve estar livre de polissacarídeos e o mais íntegro possível para que os objetivos sejam alcançados com sucesso. Em plantas, vários fatores podem influenciar a extração, incluindo desde os procedimentos para a coleta e armazenamento do tecido vegetal até o processo de extração e de armazenamento do DNA extraído. O material vegetal mais comumente utilizado para extrair DNA é o tecido foliar. Entretanto, é possível utilizar sementes, raízes, endosperma e cultura de células em suspensão.

Método CTAB da Embrapa Trigo, conforme Bonato (2008):

A) Pesar aproximadamente 300 mg de tecido foliar fresco e colocar em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL.

B) Pesar aproximadamente 300 mg de tecido foliar fresco e colocar em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

C) Macerar em nitrogênio líquido, cuidadosamente para o tecido não descongelar.

D) Adicionar 700 µL de tampão de extração CTAB (Anexo 1) pré-aquecido a 65 °C e misturar bem.

E) Incubar as amostras a 65 °C em banho-maria (ou hibridizador) por 60 min, invertendo os tubos, gentilmente, a cada 10 min.

F) Retirar do banho-maria (ou hibridizador) e deixar esfriar à temperatura ambiente por 5 min.

G) Adicionar um volume (700 µL) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Inverter gentilmente por 10 min.

H) Centrifugar a 10.000 rpm por 7 min.

I) Retirar o sobrenadante para novos tubos e adicionar um volume (700 µL) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Inverter gentilmente por 10 min.

J) Centrifugar a 10.000 rpm por 7 min.

K) Retirar o sobrenadante para novos tubos e adicionar 500 µL de isopropanol mantido a -20 °C.

L) Misturar gentilmente para precipitar o DNA.

M) Incubar a -20 °C por, no mínimo, 30 min. Neste passo, pode-se incubar durante a noite.

Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min.

N) Retirar o sobrenadante, cuidadosamente para não perder o *pellet*.

O) Lavar o *pellet* com aproximadamente 600 µL de etanol 70% gelado (-20 °C).

P) Descartar o etanol 70%.

Q) Lavar o *pellet* com aproximadamente 600 µL de etanol 96% gelado (-20 °C).

R) Descartar o etanol 96% e deixar secar à temperatura ambiente.

S) Ressuspender o *pellet* em Tris-HCl 10 mM (Anexo 1) ou água Milli-Q (50 ou 100 µL).

T) Adicionar 3 µL de RNase (10 mg/mL), misturar e incubar por 1 h a 37 °C (Anexo 1).

U) Armazenar as amostras a -20 °C ou a -80 °C, até o momento de uso.

☞ Para conservação do DNA em longo prazo,

sugere-se armazenar o material a -20 °C na forma de *pellet* em etanol 70%.

2. Purificação (limpeza) do material extraído: precipitação seletiva de polissacarídeos, de acordo com Michaels et al. (1994)

A) Ao DNA precipitado, adicionar 500 µL da solução de precipitação (ver Anexo 1).

B) Dissolver o precipitado com o vórtex.

☞ É importante que o precipitado esteja completamente dissolvido para que o DNA não seja perdido. Amostras de DNA com muito polissacarídeo demoram mais para dissolver.

C) Acrescentar 180 µL de etanol absoluto gelado. Agitar a solução com o vórtex e colocar imediatamente no gelo.

D) Deixar na geladeira (10 °C) por 20 min ou no congelador (0 °C) durante a noite.

E) Centrifugar a 10.400 rpm por 20 min a 4 °C.

F) Separar a fase aquosa para novo tubo.

☞ Nesta etapa o DNA está na fase aquosa e não no precipitado, portanto o que interessa é a fase aquosa.

G) Acrescentar 700 µL de isopropanol e misturar cuidadosamente, invertendo os tubos por cerca de 50 vezes. Deixar 15 min à temperatura ambiente.

H) Centrifugar a 10.400 rpm por 15-20 min a 4 °C.

I) Descartar o sobrenadante e secar o precipitado ao ar.

J) Acrescentar 500 µL de etanol 70% gelado e inverter o tubo por cerca de 20 vezes.

K) Centrifugar a 10.400 rpm por 20 min a 4 °C.

L) Descartar o sobrenadante e deixar o precipitado secar ao ar.

M) Ressuspender o precipitado em 20 a 100 µL de água Milli-Q ou Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (Anexo 1).

☞ **Importante:** O DNA a ser usado nas marcações de sondas deve ser sempre ressuspensionado em água Milli-Q ou Tris-HCl 10 mM pH 8,0, pois o EDTA pode influenciar na ação das enzimas utilizadas no processo de marcação.

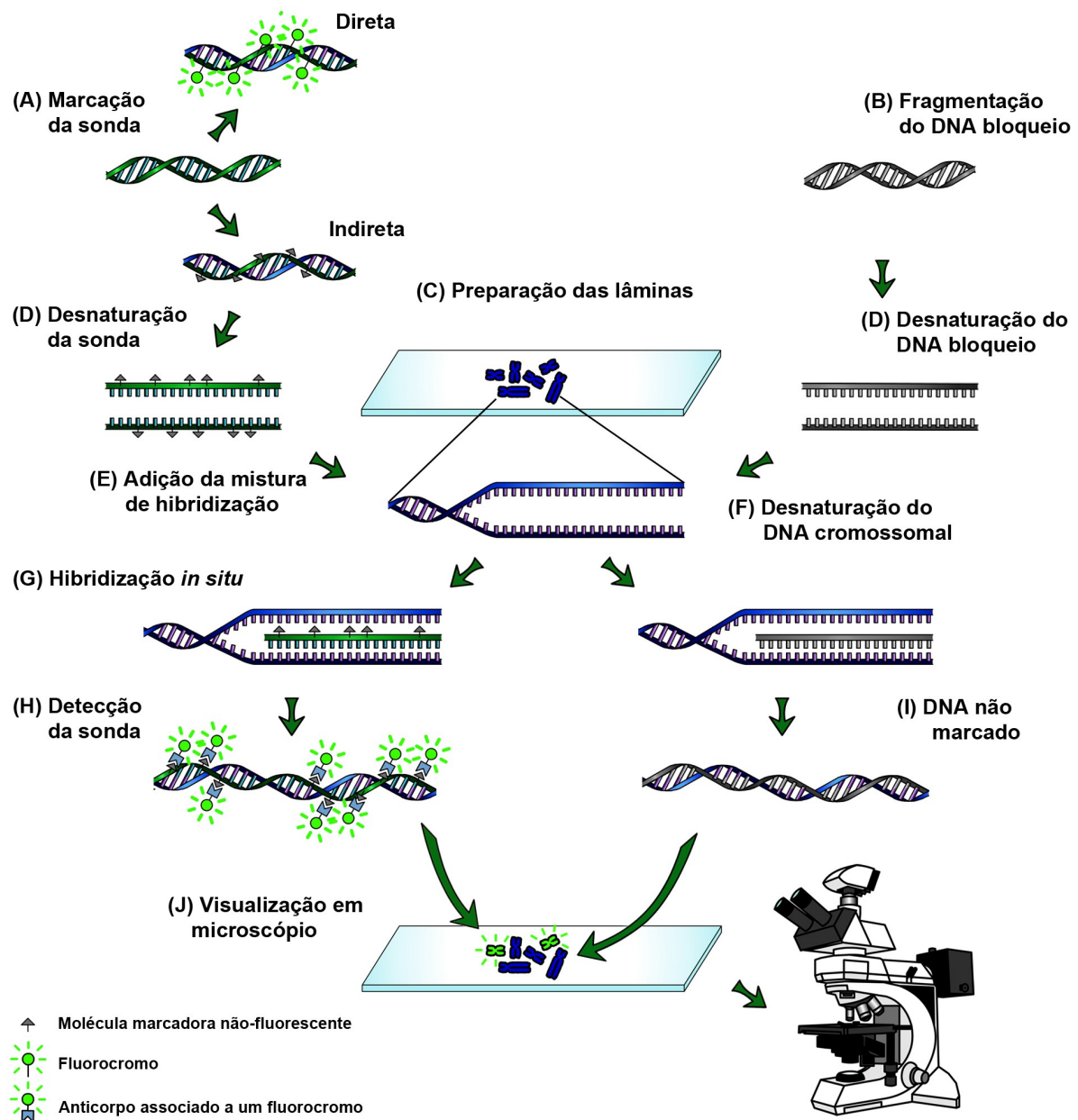


Fig. 1. Principais etapas da hibridização genômica *in situ* (GISH). **(A)** Marcação da sonda via direta ou indireta. **(B)** Fragmentação do DNA bloqueio. **(C)** Preparação das lâminas. **(D)** Desnaturação do DNA da sonda e do bloqueio, ambos em uma mistura de hibridização. **(E)** Adição da mistura de hibridização contendo sonda e DNA bloqueio à preparação. **(F)** Desnaturação do DNA cromossomal. **(G)** Hibridização *in situ* da sonda e do bloqueio nos locais de complementaridade de bases nos cromossomos. **(H)** Detecção da sonda no DNA cromossomal de um dos parentais, caso a marcação tenha sido indireta. **(I)** Molécula de DNA cromossomal do segundo parental associada ao DNA bloqueio não marcado. **(J)** Visualização dos sinais de hibridização em microscopia de fluorescência nos cromossomos associados à sonda (verde). Os cromossomos não marcados são visualizados com o contra-corante (azul). Quando a marcação da sonda é direta, a etapa de detecção na GISH é excluída, pois a sonda hibridizada já apresenta nucleotídeos com fluorocromos associados. Os fluorocromos são denominados moléculas sinalizadoras e podem ser visualizados diretamente em microscópio de fluorescência, usando um filtro apropriado (Fonte: Santelmo Vasconcelos & Ana Christina Brasileiro-Vidal, adaptado de Guerra, 2004).

3. Quantificação do DNA

A) Quantificar os DNAs da sonda e do bloqueio em gel de agarose 0,8% (Anexo 1, Figs. 2 A e 2 B).

Após extração dos DNAs a serem usados como sonda e bloqueio, deve-se proceder à quantificação dos referidos DNAs. Para tal, corre-se uma alíquota de cada um dos DNAs extraídos em gel de agarose 0,8%, usando como referência alíquotas de DNAs de pesos moleculares de 50 ng e 100 ng. Após a corrida do DNA no gel, comparam-se as bandas dos DNAs extraídos com os DNAs referência. Na amostra do DNA de centeio (Fig. 2A, amostra 2), por exemplo, sugere-se que a banda da referida amostra apresente a mesma intensidade que o marcador de 100 ng. Como foi aplicada no gel uma amostra contendo 1 μL de DNA, logo o DNA de centeio extraído apresenta uma concentração de 100 ng/ μL . Para o DNA de trigo (Fig. 2A, amostra 1), observa-se uma banda com intensidade também semelhante à banda de 100 ng. Contudo, como foi aplicado apenas 0,5 μL , então pode-se dizer que o DNA extraído de trigo possui uma concentração de 200 ng/ μL .

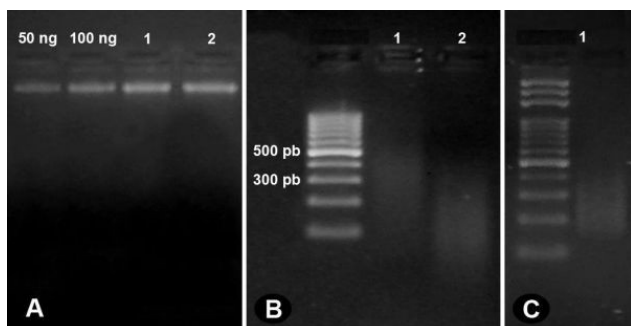


Fig. 2. Análise em gel de agarose a 0,8% do DNA genômico de trigo e de centeio a serem usados para produção do bloqueio e da sonda, respectivamente. **(A)** Quantificação dos DNAs genômicos de trigo (amostra 1; aplicação de 0,5 μL de DNA) e centeio (amostra 2; 1 μL). As duas primeiras aplicações referem-se aos marcadores de peso molecular com 50 ng e 100 ng, com aplicação de 1 μL /amostra. **(B)** Verificação da fragmentação do DNA de trigo a ser usado como bloqueio, via autoclavagem e **(C)** do DNA de centeio após marcação por *nick translation*. Em ambos os casos, os fragmentos deverão apresentar tamanho inferior a 500 pb, com uma concentração maior em torno dos 300 pb, como

observado nas amostras B2 e C1. A amostra B1 poderia ter sido fragmentada um pouco mais. O controle utilizado em **B** e **C** foi o DNA Ladder (escada) de 100 pb (Fonte: Embrapa Trigo; Departamento de Genética, UFPE).

4. Fragmentação (clivagem) do DNA bloqueio

Em geral, as espécies envolvidas na produção de híbridos são proximamente relacionadas. Por essa razão, ao se realizar uma GISH utilizando-se como sonda o DNA genômico de um dos pais, muitas vezes acontece uma hibridização não específica em cromossomos da segunda espécie parental, devido à presença de DNA repetitivo comum às duas espécies. A fim de evitar essa hibridização inespecífica, deve-se utilizar o DNA genômico não marcado extraído da segunda espécie no momento da hibridização *in situ* em conjunto com a sonda.

Assim como a sonda, o DNA bloqueio deve apresentar, no momento da FISH, um tamanho em torno de 300 pb (Fig. 2B, amostra 2), podendo ser inferior (50 a 300 pb). No caso específico do DNA bloqueio, para se realizar a fragmentação do DNA genômico extraído, primeiramente deve-se conhecer a quantidade total desse DNA. Considerando que a amostra da extração do DNA de trigo estivesse inicialmente com 100 μL , sobraram 99,5 μL após retirada de 0,5 μL para a quantificação (concentração em ng/ μL). Esses 99,5 μL devem ser quantificados [quantidade de DNA na amostra total em nanogramas (ng) ou microgramas (μg)] antes da fragmentação em autoclave (ou em água fervendo, ou em sonicador, ou por *nick translation* sem os nucleotídeos marcados). Para a fragmentação em autoclave, veja o procedimento a seguir:

A) Primeiramente, deve-se preparar uma alíquota de DNA a ser fragmentada contendo 5-50 μg de DNA (quantificado anteriormente) em 100 μL de água Milli-Q. Por exemplo, a amostra 1 da Fig. 2A apresentou uma concentração de 200 ng/ μL . Dessa forma, para um volume de 100 μL , temos uma quantidade de 20,0 μg de DNA.

☞ Usar um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL de boa qualidade a fim de evitar que este se quebre.

Deve-se vedar muito bem esse tubo em decorrência da evaporação (vedar com parafilme).

B) Colocar o tubo dentro de um frasco fechado para evitar que o tubo se abra e, assim, haja evaporação e contato do vapor da autoclave com o mesmo. Inserir o conjunto dentro da autoclave.

C) Ligar a autoclave e quando esta atingir 121 °C, marcar 5 min e, em seguida, desligar a mesma.

C) Após retirar o tubo plástico com o DNA da autoclavagem, esperar esfriar e dar um spin para baixar o volume no tubo, devido à evaporação. Correr uma alíquota em gel de agarose 0,8% junto com um DNA Ladder (escada) de 100 pb, como controle (Fig. 2B).

☞ O DNA deve ficar com fragmentos entre 100 e 300 pb.

☞ Para GISH em híbridos trigo x centeio, o DNA bloqueio deve ser concentrado a 500 ng/μL (por causa da proporção 1:10, sonda:bloqueio), já que em geral as sondas apresentam uma concentração de 50 ng/μL. Mas, para híbridos envolvendo outras espécies, a concentração do DNA bloqueio muitas vezes deverá ser maior, em função da proporção sonda:bloqueio a ser aplicada na GISH. Por exemplo, se a proporção necessária for de 1:20, o DNA bloqueio deverá apresentar uma concentração de 1 μg/μL.

E) Adicionar dois volumes (v) de etanol absoluto gelado + 1/10 v de acetato de sódio 3 M, ou 1/20 v de acetato de sódio 7,5 M, para precipitação do DNA.

☞ O volume é determinado a partir da quantidade em microlitros existente no microtubo, após a clivagem.

F) Misturar gentilmente por inversão.

G) Incubar durante a noite a -20 °C.

H) Centrifugar por 20 min a 14.000 rpm.

I) Lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 70%.

J) Centrifugar por 5 min a 14.000 rpm.

K) Deixar o *pellet* secar à temperatura ambiente ou em estufa a 37 °C.

L) Ressuspender o *pellet* em Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ou água no volume calculado de acordo com a concentração desejada. No caso descrito anteriormente, a concentração seria de 500 ng/μL.

No momento do cálculo do volume apropriado, lembrar que existe perda de DNA nas etapas de precipitação/ ressuspensão.

5. *Nick translation*

O processo de marcação de sondas por *nick translation* sempre parte de 1 μg de DNA. Os componentes da reação são: nucleotídeos não marcados (dNTPs normais – A T C G, sendo o dTTP em menor concentração), nucleotídeo marcado (dUTP) e uma mistura de enzimas composta por DNase I e DNA polimerase I (Fig. 3A-C). A DNase I hidrolisa o DNA gerando quebras (*nicks*) em cada uma das fitas da molécula de DNA aleatoriamente (um pequeno número de quebras pode levar a uma ineficiente incorporação de nucleotídeos marcados e gera sondas muito longas; por outro lado, quebras em excesso, geram sondas muito curtas). A DNA polimerase I tem três atividades: (1) uma função exonucleásica que remove bases a partir da quebra no sentido 5' → 3'; (2) uma função polimerásica que adiciona novos nucleotídeos a partir da extremidade 3', utilizando a fita oposta como molde; (3) e uma atividade de reparo 3' → 5'. Assim, nucleotídeos marcados e não marcados da mistura de *nick translation* são incorporados ao novo DNA sintetizado (ver Fig. 3F; Schwarzacher & Heslop-Harrison, 2000). Em geral, uma parte das timinas é substituída por uracilas marcadas. Contudo, apenas uma parte dessas timinas deve ser substituída, pois se todas as timinas fossem substituídas por uracilas marcadas, a conformação da molécula de DNA poderia ser alterada e, por consequência, prejudicar o processo de hibridização *in situ*.

Durante a reação, onde ocorre a quebra em uma das fitas, o DNA fica muito frágil e acaba quebrando a dupla fita, por isso este processo, além de incorporar nucleotídeos marcados, fragmenta o DNA. Quanto mais tempo de reação, menor os fragmentos. O tamanho ideal para a sonda é em torno de 200-300 pb, pois se for acima de 500 pb pode não hibridizar *in situ* adequadamente e se for menor pode ser perdida durante os banhos de pós-hibridização. Uma fragmentação apropriada indica uma marcação eficiente. O tamanho dos fragmentos deve ser averiguado em gel de eletroforese antes de parar a reação (Figs. 2C, 3G, 3H).

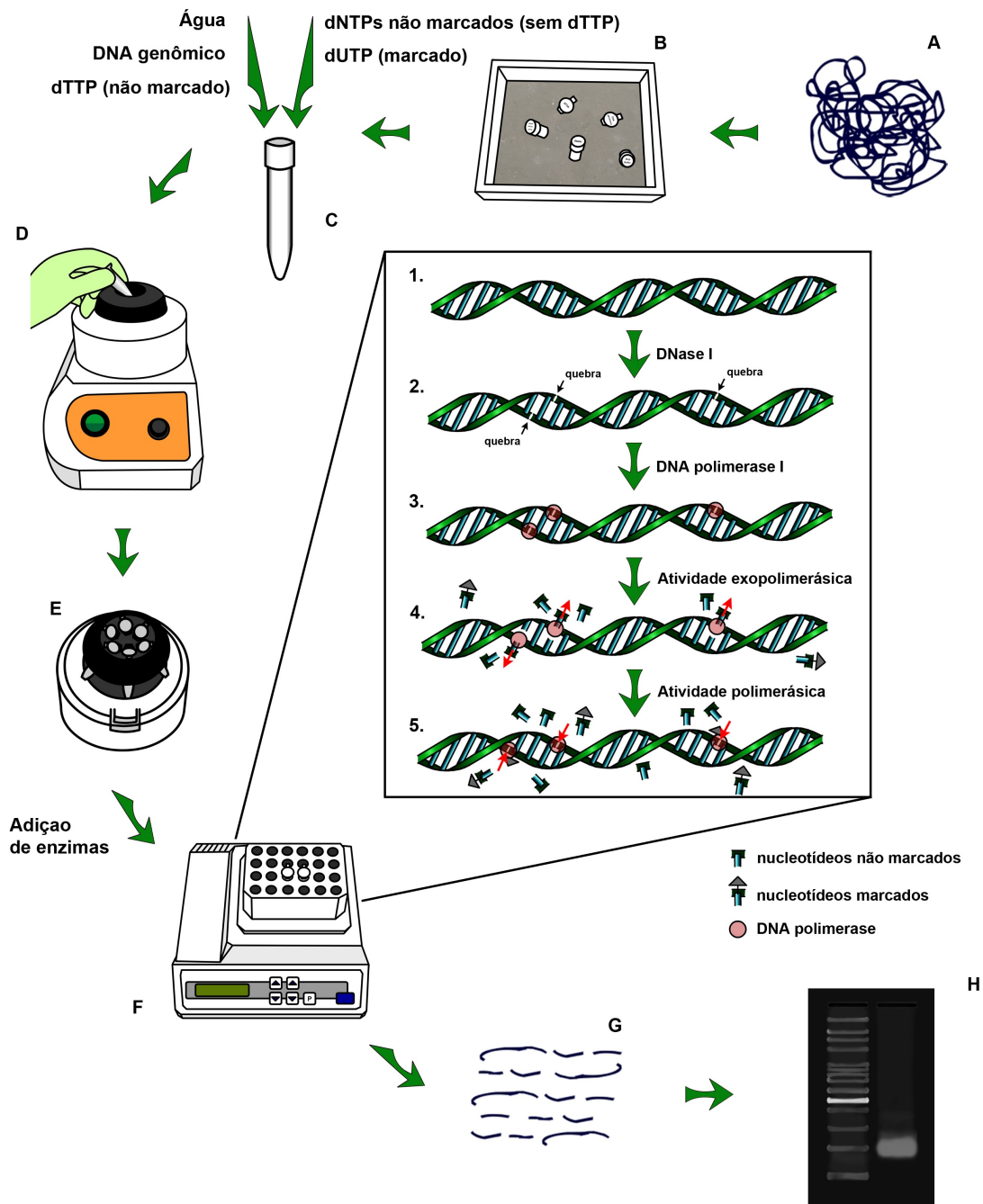


Fig. 3. Reação de *nick translation*. (A) DNA genômico total a ser marcado. (B) Componentes da reação em gelo picado. (C) Preparo da mistura de reação sem a solução enzimática. (D) Mistura da reação em vórtex. (E) Centrifugação rápida da mistura e adição das enzimas. (F) Reação de *nick translation* em termobloco a 15-16 °C, de acordo com recomendação do fabricante. (G) DNA fragmentado e marcado. (H) Gel de agarose, mostrando DNA com fragmentos de aproximadamente 200-300 pb (Fonte: Santelmo Vasconcelos & Ana Christina Brasileiro-Vidal).

As reações de *nick translation* são realizadas geralmente com kits de marcação, nas quais devem ser seguidas as recomendações do fabricante. Mas, de um modo geral, são realizadas de acordo com o procedimento abaixo:

A) Preparar a mistura de *nick translation* em tubo de microcentrífuga em gelo picado, sem a solução enzimática conforme recomendação do fabricante (Fig. 3B, 3C).

B) Vortexar a mistura, baixar o volume no tubo em microcentrífuga e acrescentar rapidamente a mistura enzimática, também de acordo com o fabricante (Fig. 3D, 3E).

C) Em seguida, misturar gentilmente, baixar o volume no tubo e colocar na temperatura recomendada em termociclador ou termobloco (Fig. 3F).

☞ Para saber se o tempo de reação recomendado pelo fabricante foi suficiente para a obtenção de fragmentos de 200 a 300 pb, suspende-se temporariamente o processo de marcação, mantendo a reação da *nick* em gelo picado a 4 °C. Em paralelo, migra-se uma alíquota (4 µL) em gel de agarose a 0,8%. Se o DNA estiver suficientemente fragmentado (Fig. 3H), acrescenta-se o tampão de parada à reação de *nick*. Caso contrário, volta-se a mistura para a temperatura recomendada, a fim de continuar a reação pelo tempo que julgar necessário. Repetir o processo até obter fragmentos com o tamanho desejado.

D) Acrescentar o tampão de parada de acordo com o fabricante.

E) Acrescentar dois volumes (2 v) de etanol gelado e 1/10 v de acetato de sódio 3 M, visando a precipitação do DNA.

☞ Ex: Para 50 µL de reação, acrescentar 100 µL de etanol gelado (2 v) + 5 µL de acetato de sódio 3 M (1/10 v).

F) Misturar gentilmente por inversão e manter a -20 °C durante a noite.

G) Centrifugar a 14.000 rpm por 20 min.

H) Descartar o sobrenadante e adicionar gentilmente 1 mL de etanol 70%.

I) Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min.

J) Descartar o sobrenadante e secar o *pellet* naturalmente ou na estufa a 37 °C.

☞ Tomar cuidado para o *pellet* não secar demais, pois fica difícil para ressuspendê-lo. Por outro lado, para uma boa ressuspensão, o *pellet* não deve conter resíduo de álcool.

K) Ressuspender o *pellet* em 15 ou 20 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

L) Armazenar a -20 °C.

6. Germinação das sementes, coleta, pré-tratamento e fixação das raízes

A) Lavar as sementes em água sanitária 4% por 5 min (Fig. 4A).

B) Lavar as sementes três vezes com água destilada por 5 min cada (Fig. 4A).

C) Colocar as sementes em placas de Petri com algodão e papel filtro umedecidos com água destilada, no escuro por 24 h a 25 °C.

D) Transferir as placas para 4 °C por 48 h.

E) Colocar as placas novamente a 25 °C por mais 24 h.

☞ O frio auxilia na sincronização celular. Quando as células são recolocadas a 25 °C, elas retomam o processo de divisão de modo sincronizado, aumentando assim o número de metáfases por lâmina.

F) No dia seguinte, coletar as raízes com comprimento de 1 a 1,5 vezes o tamanho da semente (Fig. 4B).

☞ Coletar pela parte da manhã, porque é neste período que há um maior número de células em mitose. Contudo, se algumas raízes ainda estiverem pequenas, pode-se deixar crescer um pouco mais para posterior coleta.

G) Pré-tratar as raízes. Colocar as raízes em tubo de microcentrífuga com água ultra pura (tipo Milli-Q) no gelo por 24 h a 4 °C (Fig. 4C). Adicionar no máximo seis raízes por tubo.

☞ Nessa etapa, os tubos plásticos devem ficar no gelo e abertos, porque as raízes ainda estão vivas e precisam de oxigênio.

☞ O pré-tratamento a frio visa aumentar o número de células em metáfase. Se for detectado muitas

anáfases e telófases por lâmina significa que o pré-tratamento não funcionou adequadamente.

H) Fixar as raízes em Carnoy [etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1, v/v)] por 24 h à temperatura ambiente (Fig. 4D).

☞ É necessário usar produtos de marca de excelente qualidade. Na primeira hora e meia de

fixação manter os tubos sob agitação. A fixação além de fixar o material, deixa o citoplasma mais claro. Uma boa fixação facilita a penetração da sonda nas células e nos cromossomos.

I) Estocar as raízes a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso. De preferência, usar raízes recém-fixadas.

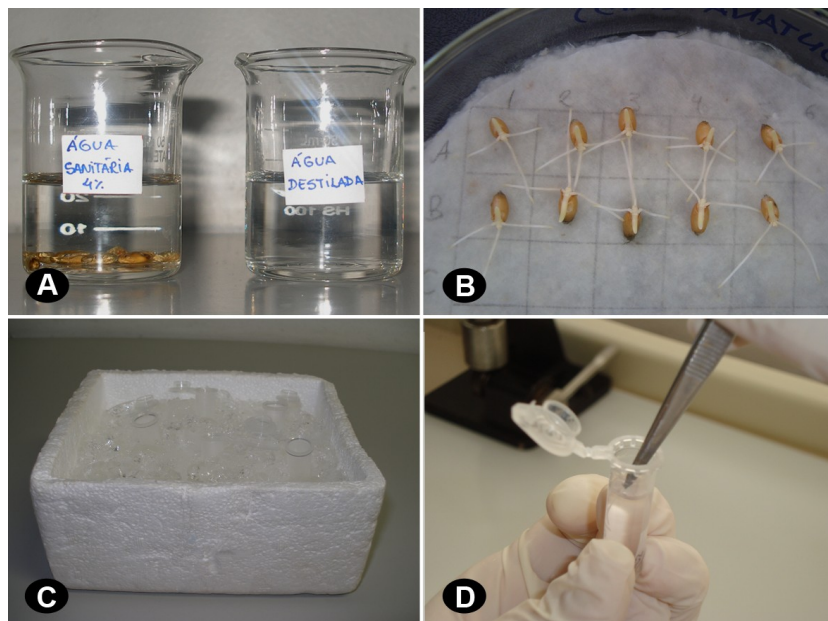


Fig. 4. Lavagem e germinação das sementes (A, B), pré-tratamento e fixação das raízes (C, D). (A) Lavagem das sementes em água sanitária 4%. (B) Raízes com comprimento de 1 a 1,5 vezes o tamanho da semente, adequadas para coleta. (C) Pré-tratamento das raízes a frio. (D) Fixação das raízes em álcool etílico absoluto:ácido acético glacial (3:1, v/v) (Fonte: Embrapa Trigo; Departamento de Genética, UFPE).

7. Preparação das lâminas

☞ Antes de iniciar esta etapa, é importante tratar as lâminas por pelo menos 6 h em HCl 6 N (Anexo 1). Em seguida, lavar em água corrente por 15 min, passar em água destilada e transferi-las para álcool absoluto onde devem permanecer até serem usadas.

A) Lavar as raízes fixadas duas vezes em água destilada por 5 min cada.

☞ Para essa etapa, lavar as raízes em placa de Petri pequena com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

B) Digerir as raízes em solução enzimática de celulase 2% (p/v) e pectinase 20% (v/v) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min a 1,5 h (Fig. 5B-C), a depender da atividade da solução enzimática (ver Guerra & Souza, 2002).

☞ Digerir uma raiz por lâmina, usando enzimas de boa qualidade. Nesta etapa, usa-se uma lupa e

retira-se a coifa e o resto da raiz, deixando apenas o meristema. Adicionar uma gota da solução enzimática com tamanho suficiente para cobrir o material. Transferir o conjunto lâmina/raiz para uma câmara úmida e manter em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A digestão enzimática auxilia no espalhamento do material sobre a lâmina.

C) Lavar os meristemas em água destilada duas vezes por 5 min cada. Para cada lavagem seca-se a raiz com auxílio de um papel filtro sem encostar na raiz para não danificá-la (Fig. 5D). Adicionar uma gota de água cuidadosamente com uma pipeta Pasteur.

D) Adicionar uma gota de ácido acético 45% no mínimo por 20 min (Fig. 5E).

☞ Quando se tem muitas lâminas, começar a contar o tempo a partir da primeira em que foi colocado o ácido acético, pois quando chegar à última o tempo da primeira já terá concluído.

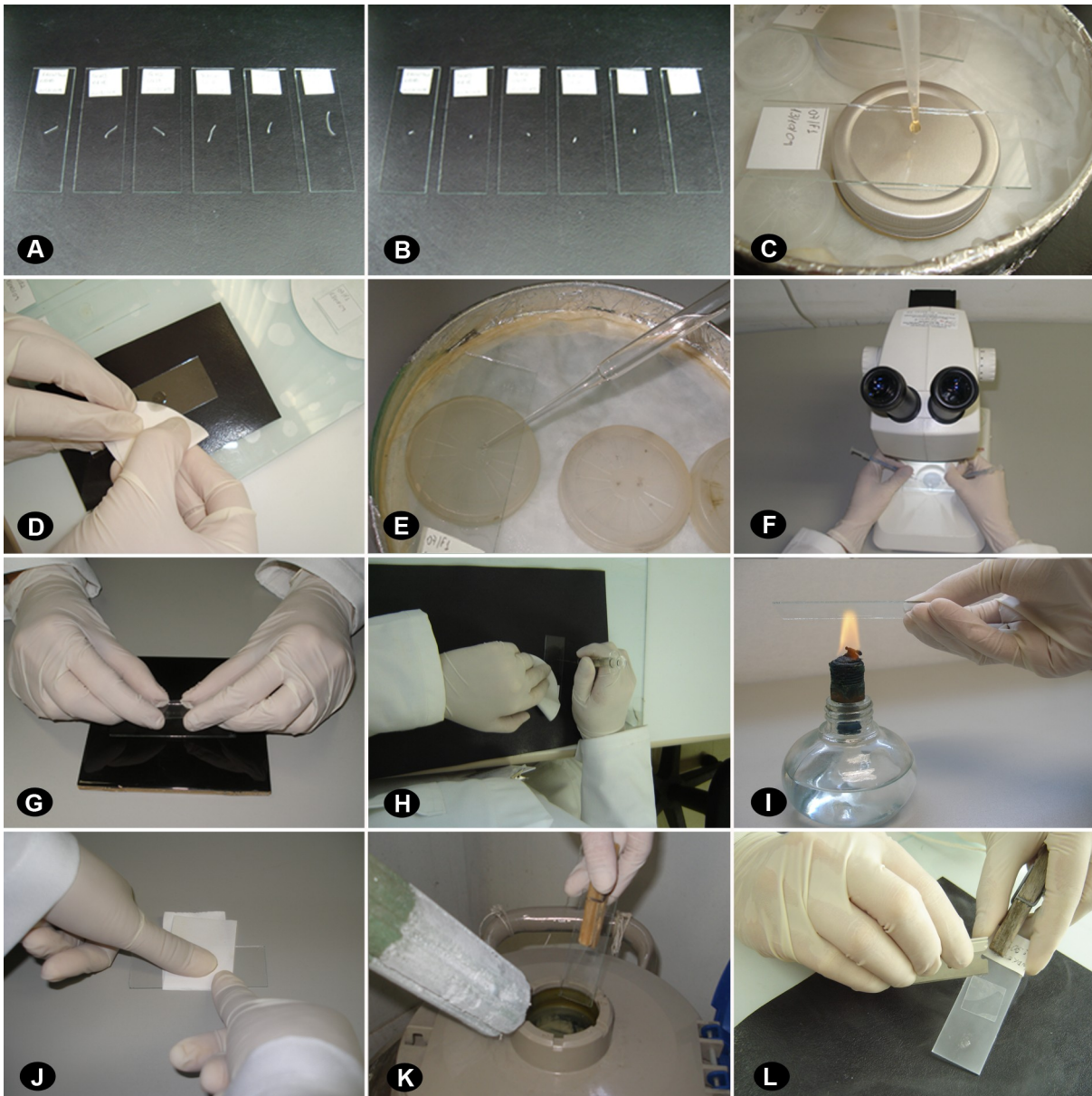


Fig. 5. Preparação de lâminas para hibridização genômica *in situ*. (A) Raízes inteiras após lavagem em água destilada. (B) Região meristemática a ser digerida. (C) Digestão enzimática. (D) Retirada da solução enzimática. (E) Adição de ácido acético 45%. (F) Dilaceração do meristema radicular, com auxílio de lupa e agulhas histológicas ou agulhas usadas para injeção de insulina. (G) Adição de lamínula 18 x 18 mm. (H) Batidas delicadas com auxílio de agulha de ponta rombuda para auxiliar no espalhamento do material e na retirada de bolhas de ar. (I) Aquecimento rápido da preparação em lamparina. (J) Esmagamento do conjunto lâmina-lamínula em papel de filtro. (K) Imersão do conjunto lâmina-lamínula em nitrogênio líquido. (L) Rápida retirada da lamínula (Fonte: Embrapa Trigo; Departamento de Genética, UFPE).

☞ Após esse passo, deve-se retirar o ácido acético, adicionar uma gota de água destilada e manter as lâminas em câmara úmida na geladeira por, no mínimo, 20 minutos ou durante a noite. No dia seguinte, secar a raiz com papel de filtro, adicionar uma gota de ácido acético 45% em todas as lâminas, mantendo sempre o material em câmara úmida até o momento da preparação. Seguir a partir do passo E para cada lâmina individualmente.

E) Secar a lâmina e colocar uma nova gota de ácido acético 45%.

F) Com auxílio de uma lupa, dilacerar o meristema com duas seringas ou agulhas histológicas, por completo ou totalmente, até que não se observem porções visíveis (Fig. 5F).

☞ Muito cuidado para o material não secar. Se isso começar a acontecer colocar mais ácido acético 45%. A quantidade de ácido acético é muito importante, pois se adicionar demais, parte do material poderá ser perdida no momento da colocação da lamínula, e se for de menos, uma parte da área da preparação ficará com ar, o que prejudicará a qualidade da preparação.

G) Colocar sobre o material uma lamínula de vidro 18 x 18 mm e bater delicadamente com uma agulha de ponta rombuda (Figs. 5G, 5H).

☞ Depois de colocar a lamínula sobre a lâmina, com o auxílio de um papel filtro dobrado, prender a lamínula com o dedo em um canto da lamínula e com uma agulha de ponta rombuda dar batidinhas de leve em todo o material para retirar as bolhas e espalhar melhor as células e os cromossomos. Bater sempre no mesmo sentido. É muito importante não mover a lamínula, pois caso contrário as células “enrolam”. Com o auxílio do microscópio, SEMPRE observar a distribuição do material antes e depois de cada batida. Essa observação é muito importante para se determinar a força colocada nas batidas. Se bater forte demais, poderá romper drasticamente as células de modo a não se encontrar mais conjuntos de cromossomos completos. Nesse caso, deve-se bater como menor intensidade. Por outro lado, se bater fraco demais, o material não se espalhará adequadamente, devendo-se aumentar a intensidade da batida. A condição ideal é a

obtenção de células rompidas, com bom espalhamento e completas. Repetir esse processo até que o espalhamento do material esteja bom.

H) Aquecer a preparação em lamparina cerca de três vezes, cuidadosamente para não ferver (Fig. 5I). Sentir a temperatura na mão.

I) Em seguida, esmagar fortemente o material. Colocar o conjunto lâmina-lamínula dentro de duas folhas de papel filtro dobrado e, com um dos dedos polegares, apoiar a lamínula em uma ponta e, com o outro dedo, apertar o material (Fig. 5J). Virar a lâmina e repetir o processo, sempre com cuidado para não mover o material.

J) Mergulhar o conjunto lâmina-lamínula em nitrogênio líquido por 3 min, aproximadamente. Cuidado para não perder a lâmina dentro do nitrogênio e para não mergulhar totalmente a lâmina, pois esta poderá quebrar (Fig. 5K).

K) Retirar rapidamente a lamínula com auxílio de uma lâmina inoxidável ou bisturi (Fig. 5L).

☞ O nitrogênio líquido congela o conjunto lâmina-lamínula. A lâmina, por ser mais grossa, demora mais a esquentar. Por essa razão, a lamínula deve ser retirada rapidamente, assim que sair do nitrogênio líquido. Dessa forma, os cromossomos ficarão bem aderidos à lâmina (parte mais gelada). Se houver um atraso na retirada da lamínula, os cromossomos poderão ficar aderidos à lamínula, podendo ser perdidos da preparação, ou ficar em dois planos na lâmina.

L) Secar as lâminas ao ar, de modo inclinado.

M) Manter as mesmas a -20 °C (ou, se possível, a -80 °C) por tempo indeterminado, até o momento da hibridização. O resultado da GISH será tão melhor quanto menor o intervalo de tempo entre a preparação das lâminas e a hibridização.

8. Hibridização Genômica *in situ*

► Primeiro dia:

Tratamento das lâminas:

☞ Antes de iniciar a hibridização, identificar a lâmina e marcar a área da preparação com caneta de ponta de diamante, sempre no sentido do comprimento da lâmina e da periferia para o centro (Fig. 6A). Nunca marcar transversalmente, a fim de evitar possíveis quebras durante os processos de secagem

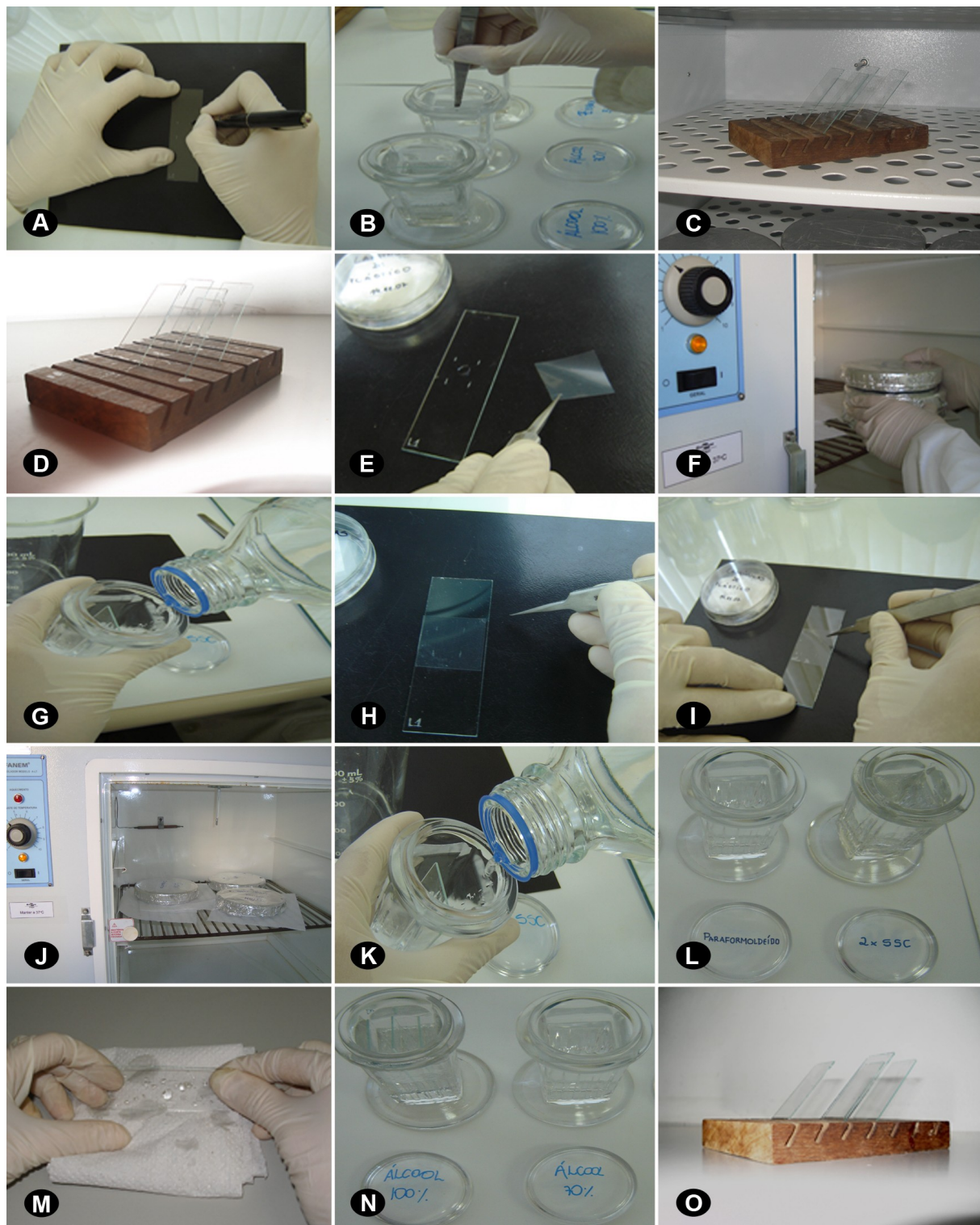


Fig. 6. Hibridização genômica *in situ*: tratamento das lâminas. (A) Identificação da área na lâmina contendo material a ser hibridizado. (B) Imersão das lâminas em álcool etílico absoluto:ácido acético glacial (3:1, v/v), seguido de etanol 70% e 100%. (C) Secagem das lâminas de modo inclinado em estufa 50-60 °C. (D) Lâminas em temperatura ambiente. (E) Tratamento das lâminas com RNase. (F) Incubação das lâminas em câmara úmida a 37 °C. (G) Imersão das lâminas em 2x SSC para retirada da RNase. (H) Adição de HCl 10 mM para preparação das lâminas para tratamento com pepsina. (I) Tratamento com pepsina. (J) Incubação das lâminas em câmara úmida a 37 °C. (K) Lavagem das lâminas em 2x SSC. (L) Tratamento das lâminas em paraformaldeído e lavagem em 2x SSC. (M) Retirada do excesso de 2x SSC em papel absorvente. (N) Desidratação do material em série etílica (70% e 100%). (O) Secagem das lâminas de modo inclinado (Fonte: Embrapa Trigo; Departamento de Genética, UFPE).

da lâmina no decorrer da FISH. Evitar anotações com caneta ou o uso de etiquetas.

☞ As lâminas guardadas por muito tempo no freezer devem passar pelo fixador Carnoy por 15 min, seguido de uma série alcoólica 70% e 100% por 5 min cada (Fig. 6B). O Carnoy ajuda a fixar melhor a estrutura dos cromossomos. Contudo, se as lâminas são novas, essa etapa não é necessária.

A) Secar as lâminas de modo inclinado (para não manchar o material) por 30 min à temperatura entre 50 e 60 °C (Fig. 6C). Esta secagem é importante para melhor aderência dos cromossomos à lâmina.

☞ Durante essa etapa, preencher uma ficha com os dados da hibridização. Para sugestão, ver Anexo 2 – Quadro 1. Os quadros 1, 2 e 3 podem ser colocados em uma mesma ficha para controle e arquivo no laboratório.

☞ O paraformaldeído a ser utilizado na etapa **I** pode ser preparado durante os intervalos das etapas **B-G** (Anexo 1).

B) Esfriar as lâminas por 5 a 10 min à temperatura ambiente (Fig. 6D). Caso necessário, essa etapa pode ser mais demorada.

C) Tratamento com RNase: adicionar 50 µL por lâmina de RNase 100 µg/mL [diluição 1:100 a partir do estoque (10 mg/mL, Anexo 1) em 2x SSC], cobrir com lamínula plástica e manter em câmara úmida a 37 °C por 1 h (Figs. 6E, 6F).

D) Lavar as lâminas três vezes em 2x SSC, por 5 min cada (Anexo 1, Fig. 6G).

☞ Em geral, para as Triticeae, as etapas **C** e **D** podem ser excluídas sem prejuízo para o processo.

E) Realizar o tratamento com pepsina:

☞ Antes de fazer este tratamento, deve-se preparar a pepsina. Para tal, conta-se o total de lâminas e multiplica-se por 50 µL (quantidade necessária por lâmina).

F) Adicionar 50 µL por lâmina de HCl 10 mM (Anexo 1), cobrir com lamínula plástica e manter por 5 min (diluir 1:100 a partir do HCl 1N ou 0,5:100 a partir do HCl 2 N) (Fig. 6H).

G) Adicionar 50 µL por lâmina de pepsina 10-15 µg/mL [diluição de 1-1,5 µL:100 µL a partir do

estoque (1 mg/mL, Anexo 1) em HCl 10 mM], cobrir com lamínula plástica e manter em câmara úmida a 37 °C por 20 min (Fig. 6I, J).

☞ Manter a pepsina e o HCl 10 mM no gelo (descongelar a pepsina lentamente). Colocar as gotas bem no centro do material, cobrir com lamínulas plásticas com o auxílio de uma pinça. Ao cobrir com a lamínula, deslizar a mesma sobre o material delicadamente até que o líquido fique espalhado uniformemente.

☞ Após os 5 min no HCl, retirar a lamínula de plástico e o excesso de HCl (para não diluir a enzima) “batendo” lateralmente a lâmina em cima de papel absorvente (semelhante ao observado na Fig. 6M). Em seguida, aplicar a pepsina e cobrir novamente com outra lamínula plástica. Manter o material em câmara úmida em estufa 37 °C por 20 min.

H) Lavar as lâminas três vezes em 2x SSC por 5 min cada (Fig. 6K).

☞ Lavar em jarro de Coplin, colocar as lâminas todas no mesmo sentido com a anotação para frente e para cima, com cuidado para não colocar duas lâminas em uma só ranhura. Porém, a última lâmina deve ser colocada de frente para a penúltima, a fim de não “arranhar” o material na parede do jarro (deve-se tomar cuidado para não esquecer que esta lâmina está ao contrário, principalmente na hora de secar o material com o papel).

☞ As lavagens podem ser feitas no mesmo jarro. Contudo, ao colocar o líquido da nova lavagem, cuidado para não adicionar diretamente no material.

I) Fixar a preparação em paraformaldeído 4% por 10 min (Fig. 6L).

• Adicionar 7,5 mL de 10x PBS (Anexo 1), completar para 75 mL de água destilada, e adicionar 3 g de paraformaldeído. Aquecer a solução em agitação, quando atingir 60 °C acrescentar 750 µL de NaOH 1N (Anexo 1) até dissolver por completo. Não deixar ultrapassar 80 °C (nunca ferver). Preparar o paraformaldeído sempre no dia do procedimento.

☞ Tomar muito cuidado com o paraformaldeído, pois este é tóxico e cancerígeno. Realizar esta etapa na capela, usar luvas e, principalmente,

máscara, pois o vapor liberado é altamente tóxico. Nesta etapa, é necessário um jarro exclusivo e identificado para paraformaldeído (usar sempre o mesmo, para evitar contaminação).

☞ O paraformaldeído ajuda a manter a estrutura do cromossomo, principalmente após a adição da pepsina. Se não usar RNase nem pepsina ou proteinase K não precisa usar o paraformaldeído.

J) Lavar três vezes em 2x SSC, por 5 min cada (Fig. 6L).

☞ Usar o mesmo jarro das lavagens anteriores em 2x SSC.

K) Secar rapidamente as lâminas em papel absorvente e desidratar as lâminas, mergulhando-as 3 min em etanol 70%, seguido por 3 min em etanol absoluto (Fig. 6M, N).

L) Secar as lâminas ao ar por pelo menos 1 h (Fig. 6O). Nesta etapa, pode-se deixar as lâminas secando por mais tempo (2-3 h).

☞ Durante esse intervalo pode-se executar os passos **A-F** do próximo item.

Hibridização *in situ* (adaptado de Heslop-Harrison et al., 1991; Pedrosa et al. 2001):

A) Mistura de hibridização (10 µL), preencher memória de cálculo como sugerido nos Quadros 1 e 2 (Anexo 2).

☞ Para a reação abaixo, a estringência é de 77%. Estringência refere-se ao percentual de pareamentos corretos no processo de hibridização e é calculada em função da concentração de formamida na solução, concentração salina (SSC) e temperatura da reação (ver Anexo 2 – Quadro 4).

B) Descongelar os componentes e preparar a mistura em gelo (Fig. 7A).

☞ Antes de preparar a mistura, contar quantas lâminas serão preparadas para fazer a quantidade certa da mistura. No caso do uso de sonda com marcação direta, a mistura e todas as etapas a partir daí devem ser feitas no escuro (não precisa ser total).

C) Colocar as gotas dos componentes na parede, próximas ao fundo do microtubo, dar um spin (centrifugar por cerca de 15 segundos), misturar

dando pequenas “batidinhas” e dar outro spin.

Componentes adicionados a 10 µL¹ de mistura de hibridização (ver Anexo 2 – Quadro 2).

Componente	Quantidade	Concentração final
Formamida 100% ²	5 µL	50%
Dextran sulfato 50% ³	2 µL	10%
20x SSC	1 µL	2x
Sonda	0,5 - 1 µL	ca. 2,5-5 ng/µL
DNA bloqueio ⁴	0,5 - 1 µL	ca. 25-50 ng/µL ¹
Água Milli-Q	qsp ⁴ 10 µL	-

¹ Devem ser aplicados de 5 a 10 µL de mistura por lâmina. Portanto, deve ser feito o cálculo para o número de lâminas a serem hibridizadas.

² Ver Anexo 1.

³ Ver Anexo 1.

⁴ A concentração do DNA bloqueio é proporcional à concentração da sonda, que para o caso específico do tritcale é de 1:10 (sonda:bloqueio). Por essa razão, para esse híbrido, o DNA bloqueio deve estar ao menos 10 vezes mais concentrado que a sonda. Para outros híbridos, a proporção sonda:bloqueio deve ser testada.

☞ A formamida desestabiliza a molécula de DNA, ou seja, ajuda na desnaturação. Cuidado ao manipular, porque também é muito tóxica.

☞ O dextran sulfato ajuda no encaminhamento da sonda ao alvo. Como ele é muito viscoso, tomar cuidado na hora de pipetar: soltar o êmbolo da pipeta bem devagar e esperar um tempo ainda para a substância terminar de subir na ponteira, só então retirar a ponteira do dextran.

☞ O volume máximo de sonda + bloqueio + água que pode ser adicionado a 5 µL de mistura é de 1 µL. Quanto melhor a sonda, menor quantidade a ser usada. A quantidade de água varia de acordo com a quantidade de sonda + bloqueio utilizada.

D) Misturar bem em vórtex, antes e após adição da sonda.

E) Incubar a mistura a 75 °C por 10 min no banho-maria para desnaturação da sonda (Figs. 1D, 7B).

F) Colocar a mistura por 5 min em gelo, para que as duas fitas mantenham-se abertas (a mistura pode permanecer mais tempo nesta fase).

G) Dar um spin antes de adicionar a mistura nas lâminas. Aplicar 5 µL da mistura por lâmina, cobrir com lamínulas de vidro 18 x 18 mm e desnaturar a 73 °C por 10 min em banho-maria (Fig. 7C, D) ou termociclador com suporte para lâminas (Fig. 1E, F). Para lamínulas 24 x 24 mm, aplicar 10 µL. Para outro grupo de espécies, usar 75 °C ou acima.

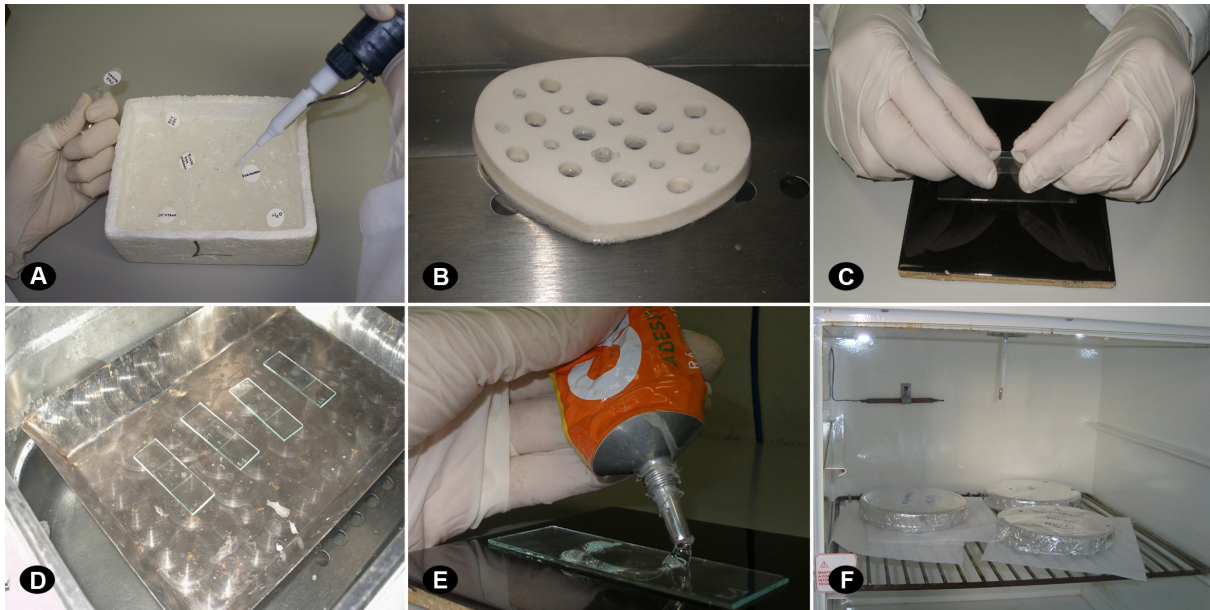


Fig. 7. Hibridização genômica *in situ*. (A) Preparo da mistura de hibridização. (B) Aquecimento da mistura de hibridização a 75 °C para desnaturação da sonda. (C) Adição da mistura de hibridização sobre o material e colocação da lâminula. (D) Desnaturação dos cromossomos em placa de metal em banho-maria a 73 °C. (E) Vedação do conjunto lâmina-lâminula com cola de borracha. (F) Hibridização *in situ* em estufa a 37 °C (Fonte: Embrapa Trigo; Departamento de Genética, UFPE).

☞ Para desnaturação das lâminas em banho-maria pode ser usado um suporte de metal previamente aquecido (ver Fig. 7D).

H) Selar o conjunto lâmina-lâminula com cola de borracha (Fig. 7E).

I) Quando a cola secar, colocar as lâminas em câmara úmida escura revestida internamente com papel de filtro umedecido.

J) Hibridizar a 37 °C durante a noite (cerca de 16 h) ou até 1 dia e meio (Figs. 1G, 7F).

K) Ajustar previamente o banho para 42 °C, pois no dia seguinte será necessário aquecer as soluções (deve-se manter ligado, nesta temperatura, durante à noite).

► Segundo dia:

Banhos pós-hibridização e detecção da sonda

A) Lavar as lâminas em banho-maria a 42 °C (Fig. 8A).

☞ Nesta etapa, os frascos contendo as soluções de SSC e o jarro de Coplin (contendo o líquido da primeira lavagem) devem estar dentro do banho-maria (Fig. 8A). Deve-se verificar com um termômetro a temperatura dentro das soluções e não do banho. Pode ser usado o mesmo jarro para

todos os banhos pós-hibridização, através do descarte da solução usada e adição da seguinte (Figs. 8B, C). O nível do banho deve estar igual ao nível do jarro e das garrafas contendo as soluções, nunca abaixo.

☞ Retirar a cola com auxílio de uma pinça sem mover a lâminula do lugar. Colocar as lâminas com lâminulas dentro do jarro de Coplin aquecido. Após adição da última lâmina, retirar as lâminulas com cuidado para não arranhar. Sempre retirar a lâminula dentro do líquido. O tempo de lavagem começa a ser contado a partir da retirada da última lâminula.

- Lavar duas vezes em solução 2x SSC, por 5 min cada (Anexo 1).

- Duas vezes em solução 0,1x SSC, por 5 min cada (estrangência de 73%. Notar a ausência de formamida, ver Anexo 1).

- Duas vezes em solução 2x SSC, por 5 min cada. Na segunda lavagem, retirar o jarro com as lâminas do banho.

- Cinco minutos em 2x SSC à temperatura ambiente.

- Cinco minutos em 4x SSC + 0,1% Tween 20 à temperatura ambiente (Anexo 1, Fig. 8D).

☞ As lavagens retiram o excesso de material da

hibridização, principalmente as sondas não hibridizadas ou hibridizadas incorretamente.

☞ Durante as lavagens, lâminas com marcação direta devem permanecer no escuro, pois já estão com fluorocromos.

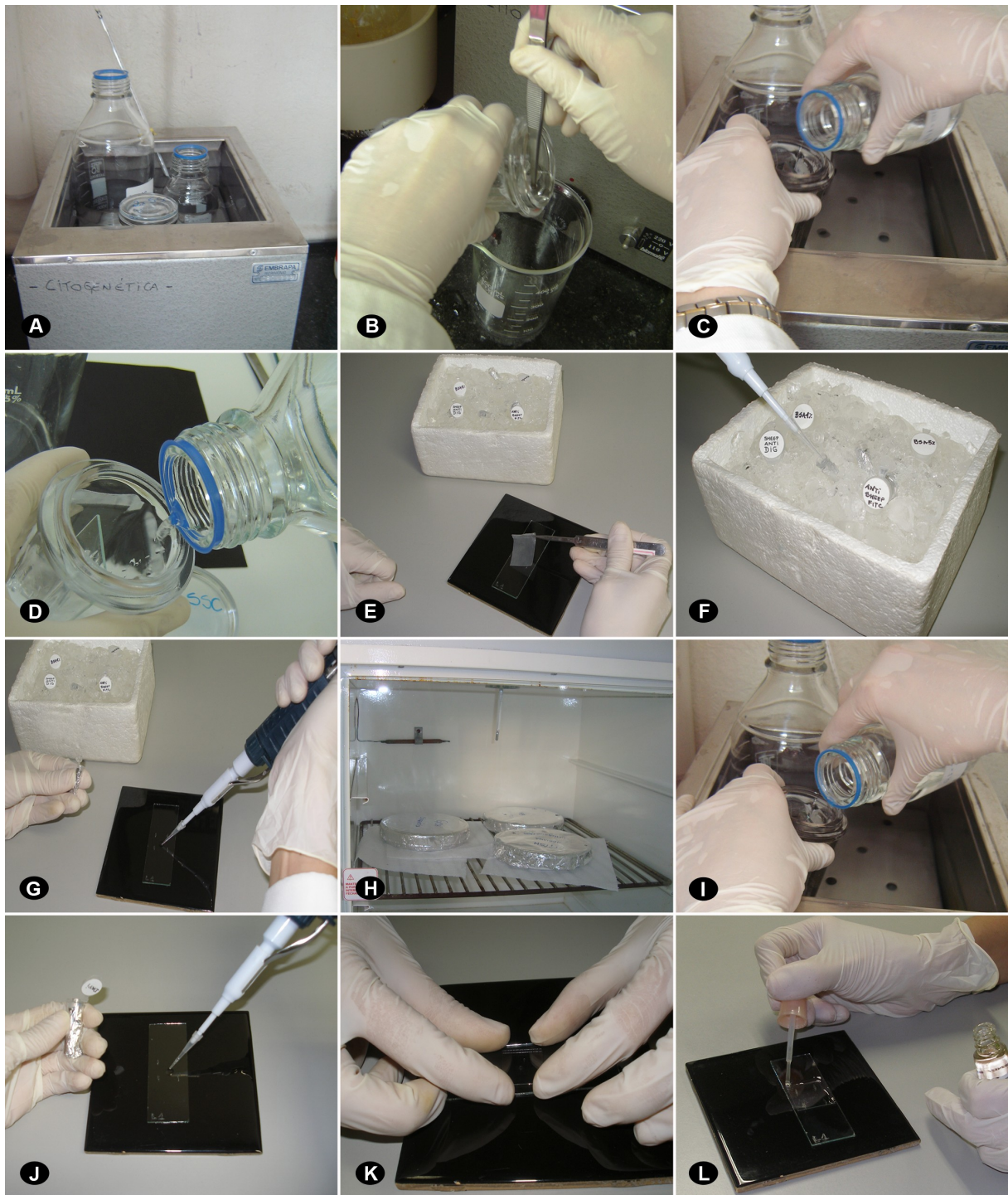


Fig. 8. Banhos pós-hibridização e detecção da sonda. (A) Lavagem das lâminas em banho-maria a 42 °C. (B) Descarte de solução salina. (C) Adição da solução salina seguinte. (D) Adição de 4x SSC + 0,1% Tween 20 à temperatura ambiente. (E) Adição de BSA 5% para a etapa de bloqueio. (F) Preparo da solução de anticorpo. (G) Aplicação da solução de anticorpo e colocação de lamínula plástica. (H) Incubação das lâminas na etapa de detecção com anticorpos em estufa a 37 °C. (I) Lavagem das lâminas em 4x SSC + 0,1% Tween 20 a 42 °C. (J) Adição de DAPI-Vectashield. (K) Adição da lamínula. (L) Vedação do material com esmalte incolor (Fonte: Embrapa Trigo; Departamento de Genética, UFPE).

OBSERVAÇÃO: Se a **marcação** for **direta** o processo termina nesta etapa, pois a sonda hibridizada já possui fluorocromos que podem ser visualizados em microscópio de fluorescência (Fig. 1J). Para tal, basta acrescentar o DAPI-Vectashield para vedar a lâmina-lamínula (seguir os passos de **K a N**).

Bloqueio e detecção:

Esta etapa de bloqueio é feita somente quando a **marcação** da sonda é **indireta**, pois nesse caso é necessário o uso de anticorpos para a detecção e visualização da sonda.

A) Adicionar 50 µL por lâmina de BSA 5% (albumina de soro bovino) em 4x SSC + 0,1% Tween 20 por 30 min em câmara úmida escura a 37 °C (Anexo 1).

☞ Nesta etapa usar lamínula de plástico (Fig. 8E).

☞ Antes de aplicar o bloqueio, secar a lâmina em baixo e dos lados.

☞ Após aplicação do bloqueio, deixar a lâmina sempre na horizontal para a lamínula não escorregar e secar o BSA. O BSA **NÃO** pode secar. Quando isso acontece, forma-se uma mancha branca em cima do material.

☞ O BSA ajuda a reduzir ou eliminar associação inespecífica dos anticorpos, reduzindo ou eliminando o aparecimento de *background*.

☞ Durante os 30 min de bloqueio, preparar as misturas de anticorpos primário e secundário (Fig. 8F).

B) Anticorpos primários (Anexo 2 – Quadro 3, Fig. 8G).

Exemplo:

Composição do primeiro conjunto de anticorpos para uma lâmina (20 µL)¹

Biotina: 1 µL de 'mouse anti-biotin' (Dako N. M 0743) + 19 µL de BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20 (Anexo 1) (proporção 1:20)².

Digoxigenina: 0,4 µL de 'sheep anti-digoxigenin' conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC) (Roche N. 11 207 741 910) + 19,6 µL de BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20 (1:50).

¹ Os anticorpos para as etapas de detecção primária e secundária devem ser escolhidos com base na molécula marcadora (biotina ou digoxigenina) usada no processo de marcação indireta da sonda.

² A proporção anticorpo:BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20 deve ser utilizada de acordo com recomendação do fabricante.

☞ Alguns anticorpos primários já estão associados a moléculas fluorescentes. Nesse caso, o restante do procedimento deve ser feito no escuro.

C) Aplicar o anticorpo primário.

D) Tirar a lamínula plástica com a pinça, escorrer o excesso de BSA e aplicar a primeira mistura de anticorpos.

E) Incubar por 1 h a 37 °C em câmara úmida, no escuro (Fig. 8H).

☞ Deixar a câmara úmida na estufa antes de usar e retirar deste local somente na hora de colocar as lâminas.

F) Lavar três vezes por 10 min cada em 4x SSC + 0,1% Tween 20 a 42 °C (Fig. 8I).

☞ Estas três lavagens são necessárias para retirar o excesso de anticorpos.

G) Anticorpos secundários:

Exemplo:

Composição do segundo conjunto de anticorpos para uma lâmina (20 µL)

Biotina: 0,7 µL de 'anti-mouse-TRITC' (Dako N. R 0270) + 19,3 µL BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20 (1:30).

Digoxigenina: 0,5 µL de 'anti-sheep-FITC' (Sigma N. F 7634) + 19,5 µL BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20 (1:40).

☞ Os anticorpos secundários amplificam o sinal por fluorescência.

H) Aplicar os anticorpos.

I) Incubar por 1 h a 37 °C em câmara úmida, no escuro.

J) Lavar três vezes por 10 min em 4x SSC + 0,1% Tween 20 a 42 °C.

K) Montar a lâmina com DAPI (2 µg/mL) em Vectashield antifade. A proporção para preparar o DAPI-Vectashield é 1:1 (Anexo 1, Fig. 8J).

L) Adicionar 8 µL de DAPI-Vectashield sobre o material, seguido de uma lamínula 20 x 20 mm ou 22 x 22 mm para cobrir bem o material (Fig. 8K).

M) Vedar as lâminas-lamínulas com esmalte incolor e secar por pelo menos 1 h, no escuro (Fig. 8L). As lâminas podem ser armazenadas em geladeira em um local escuro.

N) Analisar as lâminas em microscópio de fluorescência com o filtro adequado (Fig. 1J).

Na Fig. 9, pode-se observar a imagem de uma célula de triticales ($2n = 56$), com 14 cromossomos oriundos de centeio. Essa célula foi hibridizada com DNA bloqueio de trigo e com sonda de centeio marcada com digoxigenina e detectada com o

fluorocromo fluoresceína (FITC). Seus cromossomos foram contra-corados com DAPI. A Fig. 9A mostra os cromossomos capturados no filtro do DAPI (azul); a Fig. 9B apresenta a captura realizada com o filtro para o FITC, e, na Fig. 9C, observa-se a sobreposição das duas imagens.

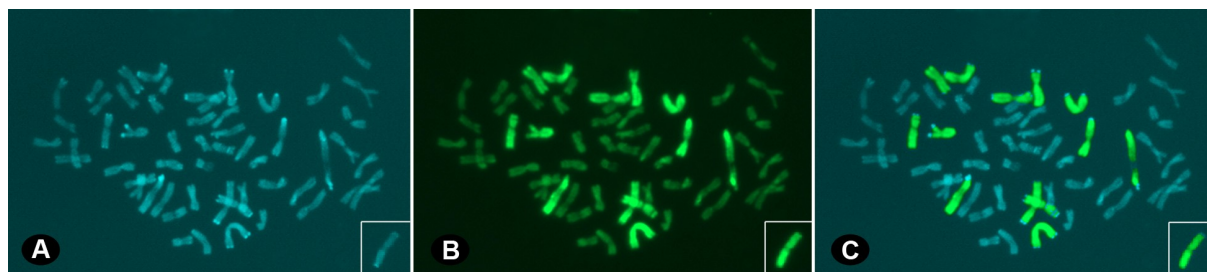


Fig. 9. Hibridização genômica *in situ* (GISH) em célula de triticales ($2n = 56$), usando DNA de centeio como sonda (verde) e de trigo como bloqueio. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (azul). A mesma célula está representada em **A** (DAPI), **B** (FITC) e **C** (sobreposição das imagens **A** e **B**). O detalhe em **A**, **B** e **C** mostra o décimo quarto cromossomo de centeio da referida célula (Fonte: Ana Christina Brasileiro-Vidal).

Referências bibliográficas

BONATO, A. L. V. **Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 11 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 235). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co235.htm>.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; BENKO-ISEPPON, A. M.; GUERRA, M. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 308-313, 2005.

BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

CHEN, Q. Detection of alien chromatin introgression from *Thinopyrum* into wheat using S genomic DNA as a probe – A landmark approach for *Thinopyrum* genome research. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 350-359, 2005.

GUERRA, M. **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184p.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**. Ribeirão Preto: Funpec, 2002, 131p.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWAZARCHER, T., ANAMTHAWAT-JÓNSSON K.; LEITCH, A. R.; SHI, M. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. **Technique**, v. 3, p. 109-115, 1991.

JAHIER, J.; CHAIN, F.; BARLOY, D.; TANGUY, A.-M.; LEMOINE, J.; RIAULT, G.; MARGALE, E.; TROTTE, M.; JACQUOT, E. Effect of combining two genes for partial resistance to Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) derived from *Thinopyrum intermedium* in wheat. **Plant Pathology**, v. 58, p. 807-814, 2009.

MICHAELS, S. D.; JOHN, M. C.; AMASINO, R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v.17, p. 274-276, 1994.

MUJJEK-KAZI, A.; KIMBER, G. The production, cytology, and practicability of wide hybrids in the Triticeae. **Cereal Research Communications**, v. 13, n. 2/3, p. 11-24, 1985.

MUKAY, Y. Perspectives in molecular cytogenetics of wheat. In: TSUNEWAKI, K. (Ed.). **Frontiers of wheat bioscience: the 100th memorial issue of wheat**

information service. Yokohama: Kihara Memorial Foundation for the Advancement of Life Sciences, 2005. p. 17-31.

PEDROSA, A.; JANTSCH, M. F.; MOSCONE, E. A.; AMBROS, P. F.; SCHWEIZER, D. Characterisation of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithogalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). **Chromosoma**, v. 110, p. 203-213, 2001.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical *in situ* hybridization**. Local: BIOS Science Publishers, 2000. 203 p.

ANEXOS

ANEXO 1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES

Tampão CTAB (50 mL)

	Concentração Final	Volume final de 50 mL
Tris-HCl 1M pH 8	100 mM	5,0 mL
NaCl 5M	1,4 M	14,0 mL
EDTA 0,5 M	20 mM	2,0 mL
CTAB 10%	2%	2,0 mL
Água Milli-Q		qsp 50 mL

Tris-HCl 1 M pH 8,0 (100 mL)

Dissolver 12,1 g de Tris base em 80 mL de água Milli-Q, sob constante agitação.

Ajustar o pH para 8,0 adicionando HCl concentrado (aproximadamente 4,2 mL).

Resfriar a solução até a temperatura ambiente e então ajustar pH final para 8,0.

Completar o volume para 100 mL com água Milli-Q.

Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (10 mL)

Fazer diluição a partir do Tris-HCl 1 M pH 8,0. Adicionar 100 µL de Tris-HCl 1 M pH 8,0 em 9,9 mL de água Milli-Q.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$1.000 \text{ mM} \times V_i = 10 \text{ mM} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_i = 0,1 \text{ mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0}$$

Solução de RNase 10 mg/mL (1 mL)

Dissolver 10 mg de ribonuclease A (Sigma, cat. N. R-5500, estocado a -20 °C) em 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e NaCl 15 mM. Aquecer a 95 °C por 10 min e colocar imediatamente em gelo por 5 min. Estocar a -20 °C.

Solução para precipitação seletiva de polissacarídeos (500 µL)

	Concentração final	Volume final de 500 µL
Tris-HCl 1M pH 8,0	10 mM	5 µL
NaCl 5M	0,25 M	25 µL
Água Milli-Q		470 µL

Gel de agarose 0,8%

Para 70 mL (quantidade necessária para cuba de eletroforese pequena):

- 0,56 g de agarose ultra-pura
- 70 mL de TBE 1x
- 1,5 µL de brometo de etídeo

Aquecer a solução contendo o tampão e agarose até que a mesma esteja completamente dissolvida (pode ser em microondas). Deixar esfriar e quando a solução estiver morna, diluir o brometo de etídeo e verter na cuba de eletroforese.

HCl 1N (300 mL)

Colocar, primeiramente, 275 mL de água destilada em uma proveta e após, acrescentar 25 mL de HCl.

HCl 6N (300 mL)

Colocar, primeiramente, 150 mL de água destilada em uma proveta e após, acrescentar 150 mL de HCl.

HCl 10 mM (50 mL)

Colocar, numa proveta, 40 mL de água destilada, adicionar vagarosamente 0,5 mL de HCl 1 N e completar para 50 mL.

Solução 20x SSC (1 L)

Dissolver 175,6 g de NaCl e 88,2 g de $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ em 500 mL de água destilada. Completar para 1 L.

Solução 2x SSC (1 L)

Diluir 100 mL de 20x SSC em 900 mL de água destilada e misturar uniformemente.

Pepsina estoque 1 mg/mL (5 mL)

Pesar 5 mg de pepsina e dissolver em 5 mL de HCl 10 mM. Observar sempre o grau de pureza do produto.

Solução 10x PBS

1 L: 1,3 M NaCl (75,8 g NaCl), 70 mM Na_2HPO_4 (12,45 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ou 9,93 g de Na_2HPO_4 anidro) e 30 mM NaH_2PO_4 (4,14 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) dissolvidos em 1 L de água destilada e o pH ajustado para 7,0.

300 mL: 1,3 M NaCl (22,74 g NaCl), 70 mM Na₂HPO₄ (3,735 g Na₂HPO₄·2H₂O ou 2,979 g de Na₂HPO₄ anidro) e 30 mM NaH₂PO₄ (1,242 g NaH₂PO₄·H₂O) dissolvidos em 300 mL de água destilada e o pH ajustado para 7,0.

Obs. Caso não se tenha NaH₂PO₄·H₂O, mas somente NaH₂PO₄ (anidro), calcula-se a exclusão da molécula de H₂O.

NaH₂PO₄·H₂O ----- 4,14g ----- 138 (PM)

NaH₂PO₄ ----- x ----- 120 (PM)

$$x = 3,6 \text{ g de NaH}_2\text{PO}_4$$

Solução 1x PBS (500 mL)

Diluir 50 mL de 10x PBS em 450 mL de água destilada e misturar uniformemente.

NaOH 1N (10 mL)

Dissolver 0,4 g de NaOH em 10 mL de água destilada.

Solução de formamida (pura - Sigma) para estocagem (deionização)

Pesar a resina BioRad [Analytical grade mixed bed resin (Ag 501-x8 Resin; 20-50 mesh, ready to use)] e adicionar à formamida líquida, em uma proporção de 1:10. Quando a resina passar de uma coloração azulada para dourada, filtrar a solução e estocar a -20 °C. Ela deverá congelar.

Solução de dextran sulfato 50% para estocagem (4 mL)

Pesar 2 g de dextran sulfato (Sigma) e dissolver em 4 mL de água destilada. Em seguida, filtrar a solução em filtro de esterilização de 20 µm, preparar alíquotas de 1 mL e estocar a - 20 °C.

Solução 0,1x SSC (1 L)

Diluir 5 mL de 20x SSC em 995 mL de água destilada e misturar uniformemente.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$20x \times V_1 = 0,1x \times 1000$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Solução 4x SSC + 0,1% de Tween 20 (1 L)

Diluir 200 mL de 20x SSC em 800 mL de água destilada e misturar uniformemente. Acrescentar 1 mL de Tween 20.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$20x \times V_1 = 4x \times 1000$$

$$V_1 = 200 \text{ mL}$$

Solução de BSA 5% em 4x SSC + 0,1% Tween 20

Pesar 0,25 g de BSA, adicionar em 5 mL de 4x SSC + 0,1% Tween 20 e esperar que o BSA se dissolva sozinho (cerca de 1 h). Ajudar, se necessário, com um bastão de vidro. Evitar a formação de espuma, a fim de preservar a atividade do produto. Em seguida, filtrar a solução, distribuir em alíquotas e estocar a -20 °C.

Solução de BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20

Pesar 0,05 g de BSA e dissolver em 5 mL de 4x SSC + 0,1% Tween 20 (ver recomendações no Anexo 1). Filtrar a solução, distribuir em alíquotas e estocar a -20 °C.

Solução DAPI-Vectashield

Para 500 µL de solução, misturar de modo homogêneo 250 µL de DAPI (previamente preparado, 2 µg/mL) + 250 µL de Vectashield. Esta solução deve ser guardada sempre a -20 °C.

ANEXO 2 - EXEMPLOS E QUADROS PARA AS MEMÓRIAS DE CÁLCULOS NAS HIBRIDIZAÇÕES *IN SITU*

Quadro 1. Descrição do material, tipo de sonda e resultados obtidos.

Responsável: _____ Data: __/__/__.			
Lâmina Nº	Material	Sonda	Resultado
01	Acesso 26799	Centeio/01 - FITC (Mistura 1 – M1)	Deve ser informado após as hibridizações para se ter uma memória dos experimentos
02	OCT 97	Centeio/08 - Dig (M2)	
03	PF 838197	Centeio/08 - Dig (M2)	

Quadro 2. Memória de cálculo para a mistura de hibridização.

Responsável: _____ Data: __/__/__.					
Componente	Quantidade (µL)	Total	Mistura		
			1	2	
Formamida 100%	2,5	7,5			
Dextran sulfato 50%	1	3			
20x SSC	0,5	1,5			
Subtotal	-	12	4	8	
Sonda + bloqueio + H₂O	1		0,5 Bloqueio	1 Bloqueio	
			0,5 Sonda	1 Sonda	
Total	5		5	10	

Quadro 3. Descrição dos anticorpos e antianticorpos caso a marcação seja indireta.

Conjunto	Anticorpo	Quantidade por lâmina (µL)		Número de Lâminas ¹	Total por conjunto (20 µL)	
		Anticorpo ¹	BSA 1%		Anticorpo	BSA 1%
1°	<i>Mouse anti-biotin</i>	1	19	-	-	-
	<i>Sheep anti-digoxigenin</i>	0,4	19,6	2	0,8	39,2
	<i>Mouse anti-bio + Sheep anti-dig</i>	1 + 0,4	18,6	-	-	-
2°	<i>Anti-mouse-TRITC</i>	0,7	19,3	-	-	-
	<i>Anti-Sheep-FITC</i>	0,5	19,5	2	1	39
	<i>Anti-mouse-TRITC + Anti-Sheep-FITC</i>	0,7 + 0,5	18,8	-	-	-

¹ A concentração dos anticorpos deve seguir a recomendação do fabricante. Por exemplo, para reconhecer a biotina, a recomendação do fabricante para diluição da antibiotina é de 1:20, ou seja, deve-se adicionar 1 µL de antibiotina em 19 µL de BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20. Para estreptavidina CY3, o fabricante recomenda uma diluição de 1:100 (para uma solução de 20 µL, usar 2,0 µL de estreptavidina + 19,8 BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20). No caso de avidina FITC, o fabricante recomenda 1:50 (para uma solução de 20 µL, usar 0,4 µL de anticorpo + 19,8 BSA 1% em 4x SSC + 0,1% Tween 20).

² Número de lâminas hibridizadas com sondas de marcação indireta.

Quadro 4. Percentagem de estringência de DNA:DNA para sondas com 43% de conteúdo GC e com aproximadamente 300 pb.

SSC	Formamida % (na solução final)												
	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5	0
(A) 37 °C													
5 X	76	73	70	67	64	61	58	55	52	49	46	43	40
2	83	80	77	74	71	68	65	62	59	55	52	49	46
1	88	85	82	79	76	73	70	67	64	60	57	54	51
0,75	90	87	84	81	78	75	72	69	66	63	59	56	53
0,5	93	90	87	84	81	78	75	72	69	65	62	59	56
0,2	100	96	93	90	87	84	81	78	75	72	69	66	63
0,1	105	101	98	95	92	89	86	83	80	77	74	71	68
(B) 42 °C													
5 X	81	78	75	72	69	66	63	60	57	54	51	48	45
2	88	85	82	79	76	73	70	67	64	60	57	54	51
1	93	90	87	84	81	78	75	72	69	65	62	59	56
0,75	95	92	89	86	83	80	77	74	71	68	64	61	58
0,5	98	95	92	89	86	83	80	77	74	70	67	64	61
0,2	105	101	98	95	92	89	86	83	80	77	74	71	68
0,1	110	106	103	100	97	94	91	88	85	82	79	76	73

Fonte: Schwarzscher & Heslop-Harrison, 2000 (para maiores detalhes ver Capítulo 7 – Stringency and kinetics).

**Comunicado
Técnico Online, 270**



Embrapa Trigo
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970
Passo Fundo, RS
Fone: (54) 3316 5800
Fax: (54) 3316 5802
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

**Comitê de
Publicações**

Comitê de Publicações

Presidente: **Leandro Vargas**

Anderson Santi, Antônio Faganello, Casiane Saete Tibola, Leila Maria Costamilan, Lisandra Lunardi, Maria Regina Cunha Martins, Sandra Maria Mansur Scagliusi, Sandro Bonow

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

BRAMMER, S. P.; POERSCH, L. B.; OLIVEIRA, A. R. de; VASCONCELOS, S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. **Hibridização genômica *in situ* em Triticeae**: um enfoque metodológico. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 15 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico online, 270). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co270.htm>.