Методика виявлення нуклеїнових кислот за допомою гібридизації *in situ*

Гібридизація *in situ* (ГІС)

- **Це метод прямого виявлення нуклеїнових кислот у клітинних структурах в умовах, що дозволяють одночасно досліджувати і їх морфологію.**

- Використовують для:
  - ***Картування геномів***
  - ***Виявлення хромосомних перебудов***
  - ***Виявлення поліморфізму ДНК***
  - ***Визначення статі***
  - ***Внутрішньоклітинної локалізації мРНК***
  - ***Хромосомної локалізації унікальних генів.***

- Метод розробили **Пардью і Голл в 1969 р.** (для вірусів) з використанням ^{32}P - мічених зондів для:
- Виявлення вірусних нуклеїнових кислот в інтерфазному ядрі
- Хромосомоспецифічних копій
- Локалізації специфічних мРНК
- Транслокацій

Картовано чимало генів людини:

- Ген легкого ланцюга імуноглобуліну Х (*IGK*)
- Гени гістонів (*H1, H2A, H2B, H3, H4*)
- Гени інтерферонів α і ß (*IFL, IFF*)
- Ген інсуліну (*INS*)
- Кластер генів гормону росту (*GH*)
- та ін.

• Вибір методики

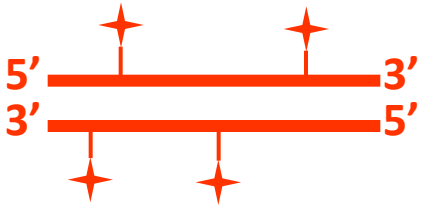
Залежить від наступних факторів:

- Природи нуклеїнової кислоти-мішені.
- Чутливості.
- Специфічності.

 вартість, безпечність, наявність реактивів та обладнання.

Принцип утворення ДНК-ДНК гібридів

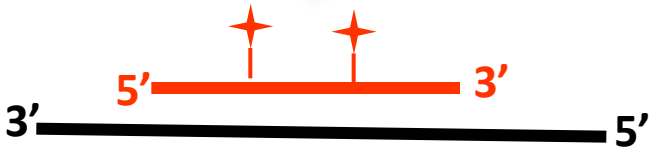
Мічений ДНК-зонд



ДНК-мішень

Денатурація ДНК-зонда та ДНК-мішені

Змішування ланцюгів ДНК-зонда та ДНК-мішені



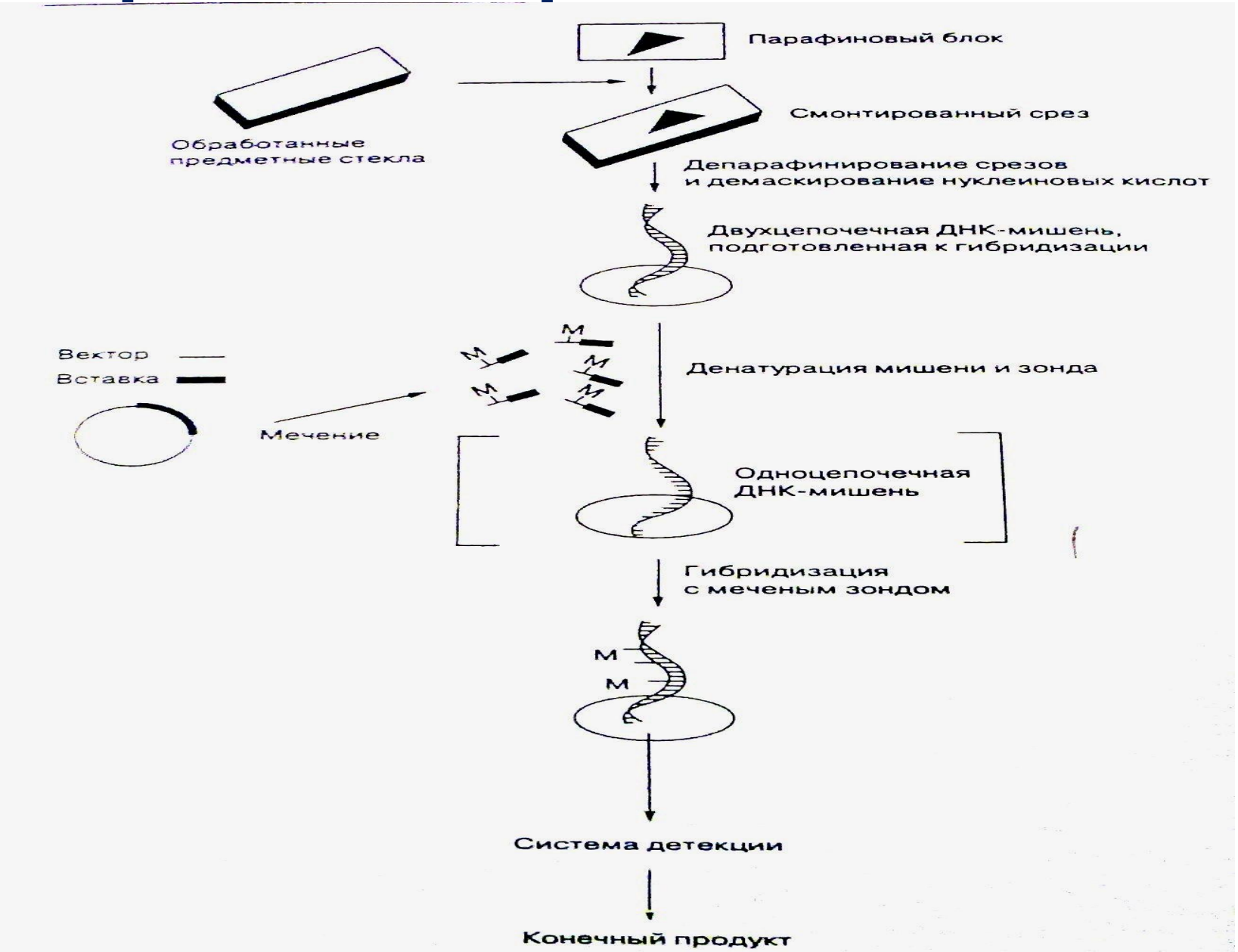
Якщо в ДНК-мішені є послідовності, комплементарні до ДНК-зонду, то утворюються молекулярні гібриди, які можна виявити завдяки мітці

- ***Методики визначення РНК і ДНК за допомогою ГІС відрізняються, оскільки різниця є у всіх етапах –від отримання клітин і тканин до способу детекції.***

- ***Чутливість залежить від мішені, яку необхідно визначити, наприклад, для епідеміологічних досліджень латентних вірусних інфекцій метод має бути високочутливим, а для визначення багато повторюваної послідовності – малочутливим.***

Чутливість методу залежить від особливості всіх етапів, від фіксації препарату до вибору фермента для детекції.

Принцип гібридизації *in situ*



Мітки та їх детекція

Свидетель	Система детекции
Биотин	Антитела—авидин
Дигоксигенин	Антитела
Ртуть	Химические агенты—антитела
Ацетиламинофлуорен	Антитела
Сульфогруппы	Антитела
Ферменты	Прямое внесение

Зонд і його мічення

- **Дволанцюгові ДНК-зонди**

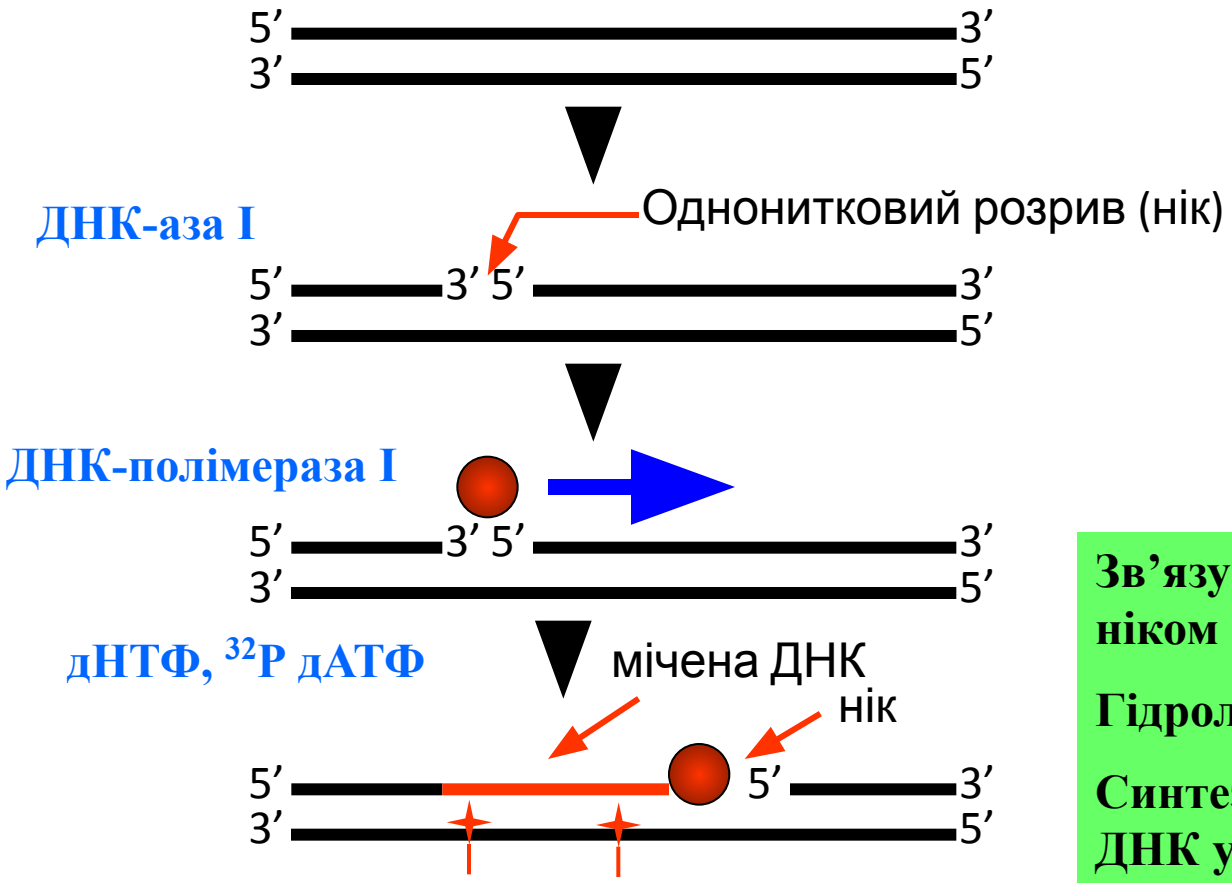
  Використовуються для виявлення ДНК, проте також використовуються і для гібридизації РНК. Представляють собою бактеріальні плазміди із вбудованою специфічною послідовністю.

а) нік-трансляція;

б) метод розсіяної затравки;

в) ПЛР.

Метод нік-трансляції



Поява розривів в одному з ланцюгів ДНК

Зв’язування ДНК-полімерази I з ніком

Гідроліз ДНК у напрямку 5’→3’

Синтез міченого ^{32}P ланцюга ДНК у напрямку 5’→3’

Рис. 13.3. Мечение ДНК методом рассеянной затравки.

Зонди

- Одноланцюгові ДНК-зонди
- Одноланцюгові РНК-зонди
- Олігонуклеотидні зонди
- Зонди, отримані за допомогою ПЛР

Олігонуклеотидні зонди

- 1) з чітко вираженою послідовністю (19 - 40 нуклеотидів);
- 2) з сильно виродженими послідовностями (17 - 20 нуклеотидів);
- 3) з менше виродженими послідовностями (30 – 70 нуклеотидів).

- **Фіксація препаратів і підготовка предметних скелець.**

  - **Попередня обробка зрізів включає:**

-депарафінування зрізів тканин, залитих в парафін;

-демаскування нуклеїнової кислоти-мішені;

-обробка ДНКазою або РНКазою;

-передгібридизація зрізів.

Зразки

- 1) мазки (фіксують в р-ні Карнуа);
- 2) виготовлені шляхом центрифугування;
- 3) біоптати:
- а) парафінові зрізи (фіксують в параформальдегіді);
- б) кріостатні зрізи (фіксують у формаліні, р-ні Боуена, ф-рі Періодат Na – лізин-параформальдегід-глутаральдегід).

Денатурація та гібридизація.

Необхідність денатурації визначається типом зонду і нуклеїнової кислоти-мішені.

Гібридизація і визначення умов жорсткості.

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41 (\%GC) – 0,72F – 650 / L$$

L - довжина пар нуклеотидів.

M – концентрація моновалентних катіонів.

F – вміст у реакційній суміші формаміду.

- У випадку гібридів з неправильно спареними нуклеотидами необхідно відкорегувати формулу. Ступінь ренатурації залежить від умов гібридизації і відмивки зразка.
- Температура плавлення незавершених дуплексів (T'_m) нижча T_m повністю комплементарних гібридів:

$$T'_m = T_m - \alpha\ (\%\ \text{некомплементарних нуклеотидів})$$

Відмивка зразків після гібридизації і інгібування ендогенної ферментативної активності

Зразок відмивають після гібридизації для того, щоб:

- Видалити негібридизовані зонди.
- Блокувати неспецифічно зв’язані антитіла і неспецифічну ферментативну активність.
- Зробити умови гібридизації жорсткими.

FISH.
Практичне значення

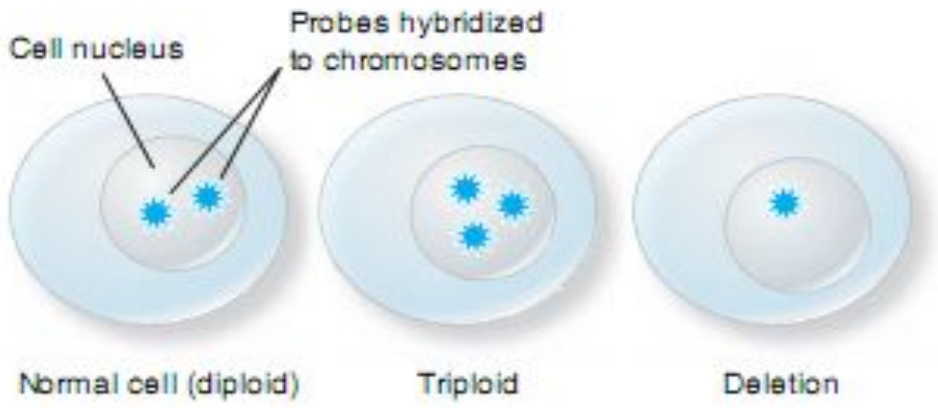
- Визначення змін кількості хромосом.
- Визначення статі дитини.
- Для діагностики захворювань та підтвердження діагнозу.
- Для детекції перебудов хромосом: делецій, дуплікацій, транслокацій, мікроперебудов.
- Для моніторингу залишкових явищ онкозахворювання після хіміотерапії і пересадки кісткового мозку.
- Для детекції скорочення хромосом.
- **Матеріалом** для дослідження є кров, кістковий мозок, біопсія пухлин, плацента, ембріональні тканини, амніотична рідина.
- Дозволяє одночасно аналізувати більше 500 клітин.

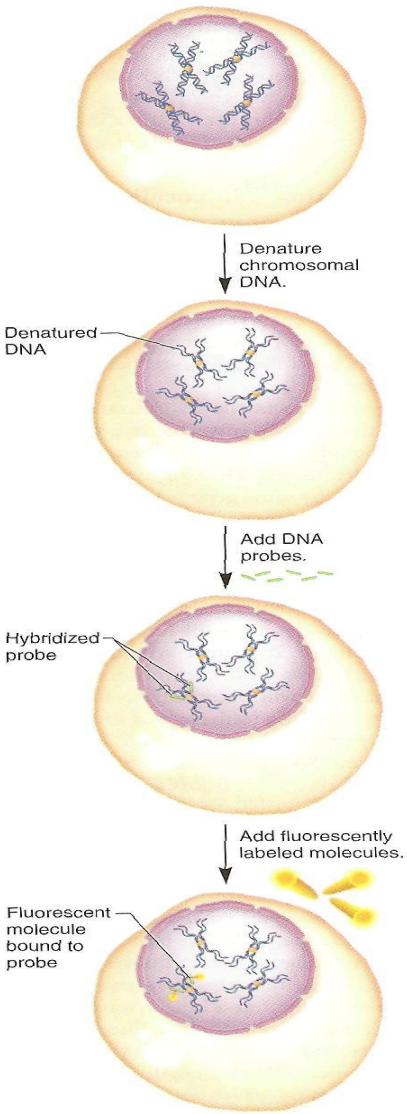
FISH-метод

Використовується для виявлення ДНК, РНК та білків у клітині або *in situ.*

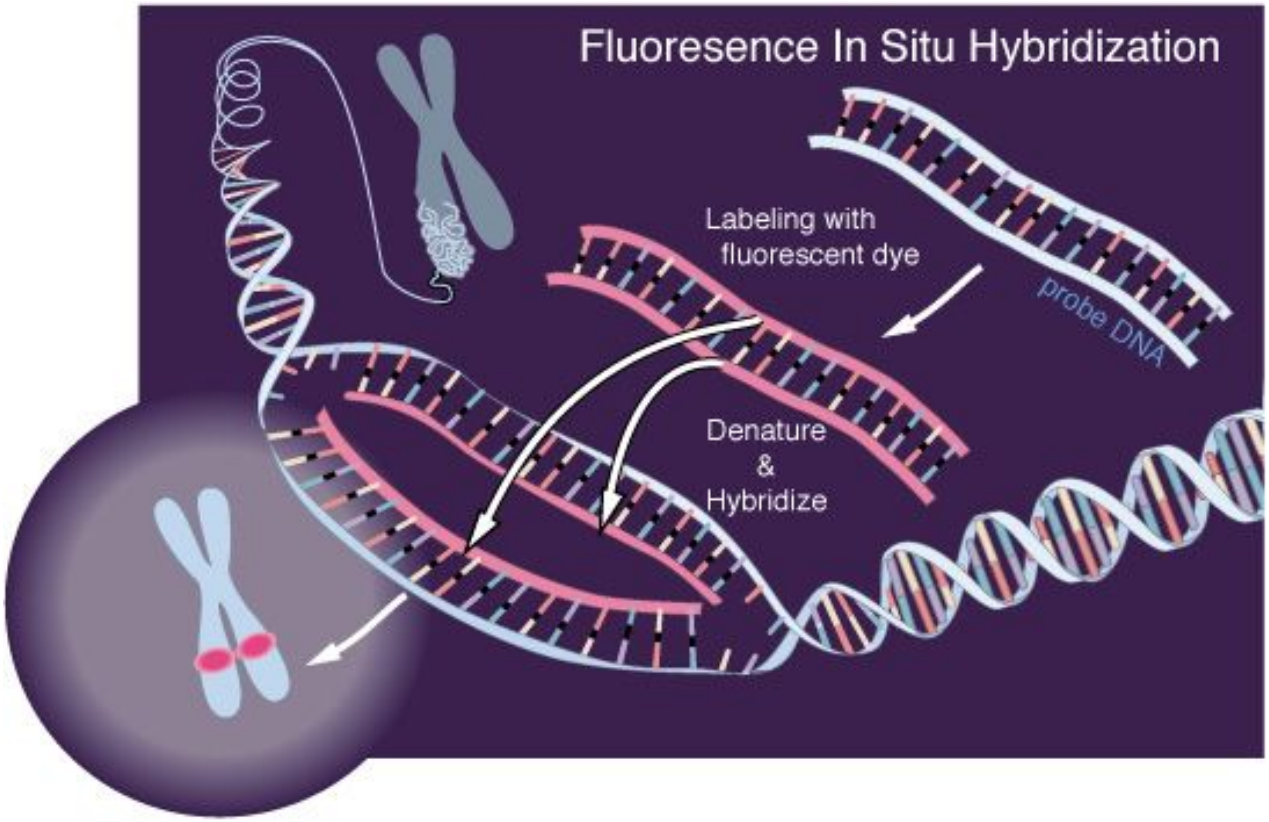
Суть методу: якщо у пробі наявна досліджувана ділянка, комплементарна міченому флюоресцентною міткою зонду (60-200 kb), то проходить гібридизація, і мітка проявляється у флуоресцентному мікроскопі.

Дає змогу виявляти делеції та дуплікації хромосом (проявляється менша чи більша кількість міток, порівняно з контролем).





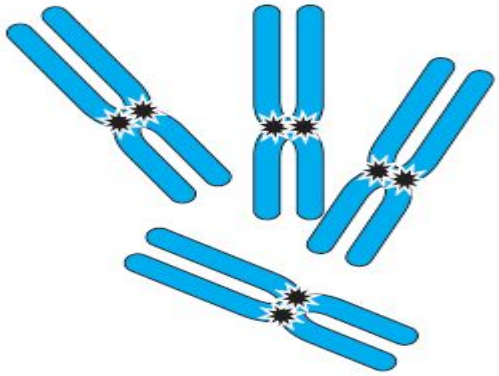
FISH



- **Використовують три типи зондів:**
  - Зонди на всю хромосому;
  - Зонди до центромер;
  - Зонди до конкретного локусу хромосоми.

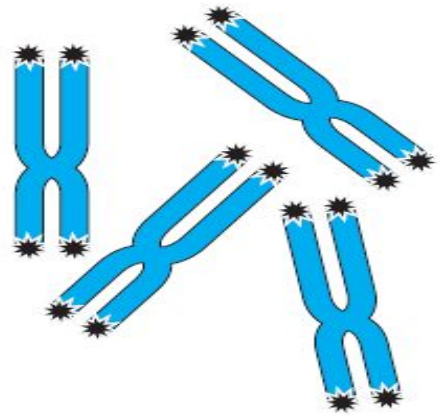
Для FISH методу використовують такі типи зондів:

- ***Локус-специфічні**, зв'язуються з відповідними ділянками хромосом. Дані зонди використовуються для ідентифікації певної короткої послідовності нуклеїнової кислоти.*
- ***Альфоїдні або центромерні зонди-повтори,** до послідовності центромерних ділянок хромосом. З їх допомогою кожна хромосома може бути зафарбована в певний колір, що дозволяє швидко визначити число хромосом і відхилення від цього числа*

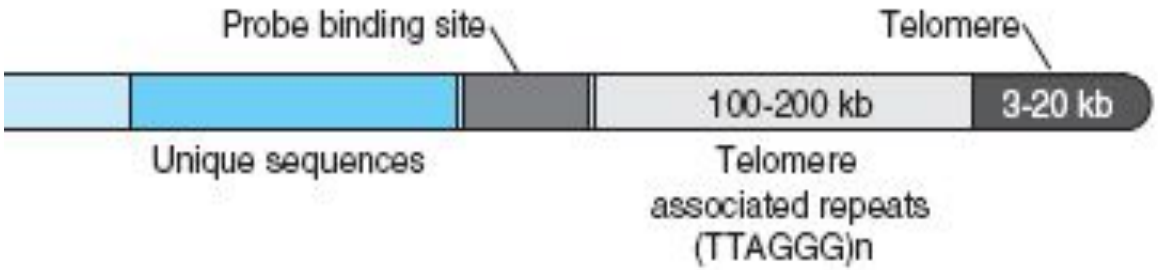


Centromeric probes

✔ ***Теломерні зонди,*** *використовують для детекції невеликих делецій, які неможливо візуалізувати при каріотипуванні*

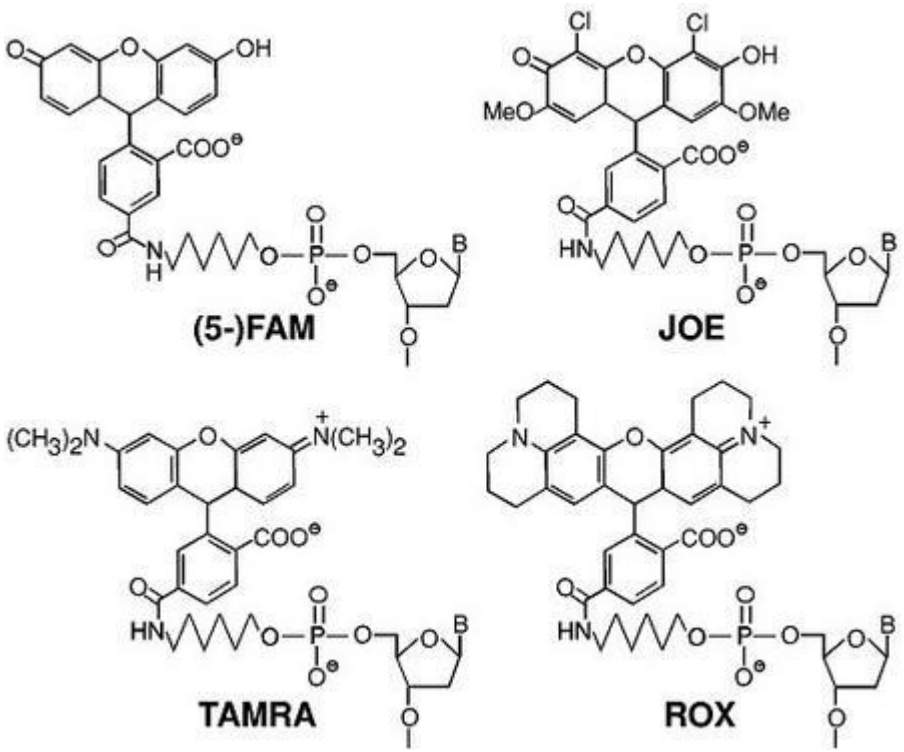


Telomeric probes



✔***Зонди на всю хромосому*** *- набір невеликих зондів до окремих ділянок хромосоми, але в цілому вони перекривають всю хромосому. Використовуючи бібліотеку таких зондів, можна "розкрити" всю хромосому і одержати диференційний спектральний каріотип індивіда. Використовується для аналізу хромосомних транслокацій, коли фрагмент однієї хромосоми переноситься на плече іншої.*

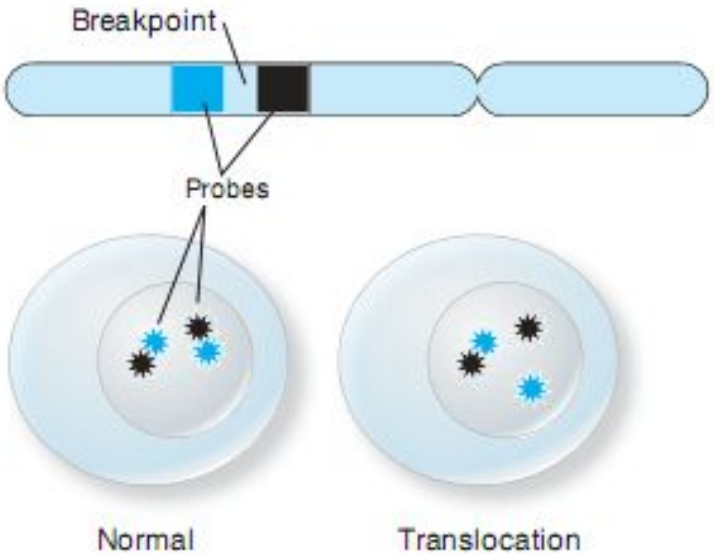
Флуоресцентні мітки ДНК

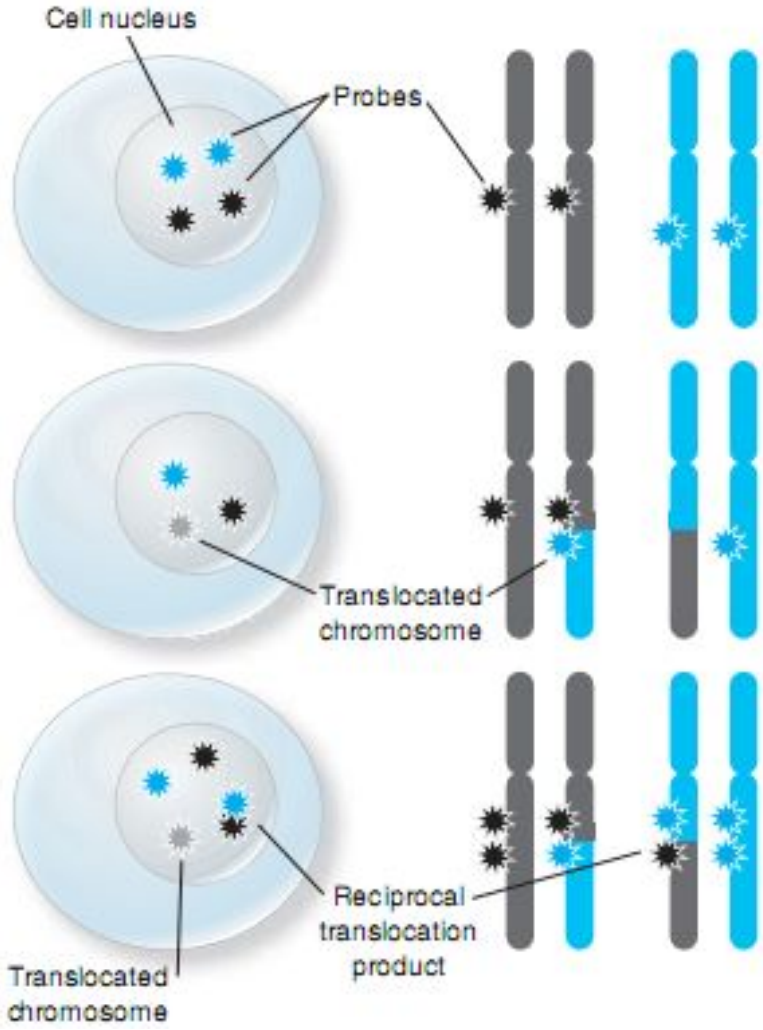


- Флуоресценцію збуджують лазерними променями
- Довжина хвилі максимальної емісії флуоресценції відрізняється для різних сполук
- Різні типи нуклеотидів мітять різними мітками і випромінюють світло з різною довжиною хвилі (різного кольору)

FISH-метод

Транслокації виявляються з використанням ***різнокольорових міток***, комплементарних до ділянок кожної хромосоми, по якій відбулась транслокація.Транслокована хромосома містить дві мітки (свою і хромосоми, елемент якої одержала). Недолік – мітка може зв’язатися з нетранслокованою хромосомою, що знаходиться поряд із досліджуваною. Інший метод – використання двох міток, розділених неміченим фрагментом. Транслокована хромосома містить “розрив” між мітками.





ОБМЕЖЕННЯ FISH

1) обмежується діагнозом на рівні хромосом, а не на рівні одного гена;

2) втрата ядер при виготовленні препаратів бластомерів.

- Для визначення статі в поодиноких клітинах, детекції анеуплоїдій і дефектів окремих генів є методи PRINS та флюоресцентний ПЛР-аналіз.
- **PRINS-**метод – подібний до FISH, але не потребує попереднього мічення зонду, оскільки реакція мічення відбувається *in situ*.

Модифікації FISH-методу

- *метод зворотного мічення (reverse painting);*
- *метод порівняльної геномної гібридизації (CGH);*
- *спектроскопічний аналіз хромосом (багатоколірне спектральне каріотипування – multicolor spectral karyotyping, SKY).*

Порівняльна геномна гібридизація (CGH-comparative genomic hybridization)

Базується на порівнянні тестованої та нормальної ДНК, мічених різними флюорохромами, які змішуються в пропорції 1:1 та гібридизуються на метафазних хромосомах каріотипово здорової людини. Потім знімається серія зображень одного і того ж поля зору з використанням різних фільтрів.

ПЕРЕВАГИ:

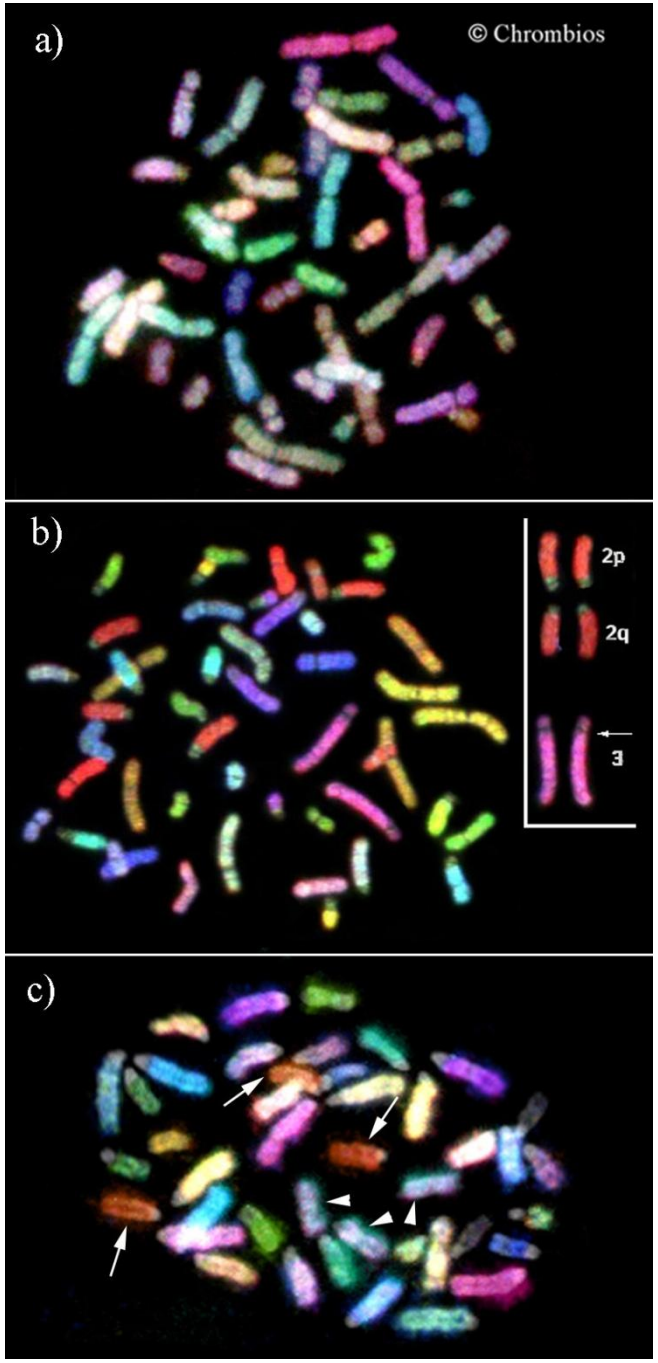
1) **не залежить від джерела досліджуваного матеріалу і може бути проведена з невеликою кількістю ДНК, включаючи архівний матеріал;**
2) **можна провести повний аналіз структурних аномалій в хромосомах всього геному за один раз;**
3) **не потребує виготовлення препаратів метафазних хромосом з досліджуваної тканини.**

aCGH- проведення методу на чіпах (використовується при проведення ЕКЗ)

FISH-метод

Multi-FISH фарбування і схема використання трьох барвників і їхніх комбінацій дає можливість отримати сім кольорів

Chromosome	color 1	color 2	color 3		resulting color
22					
9					
1					
8					
17					
19					
—					



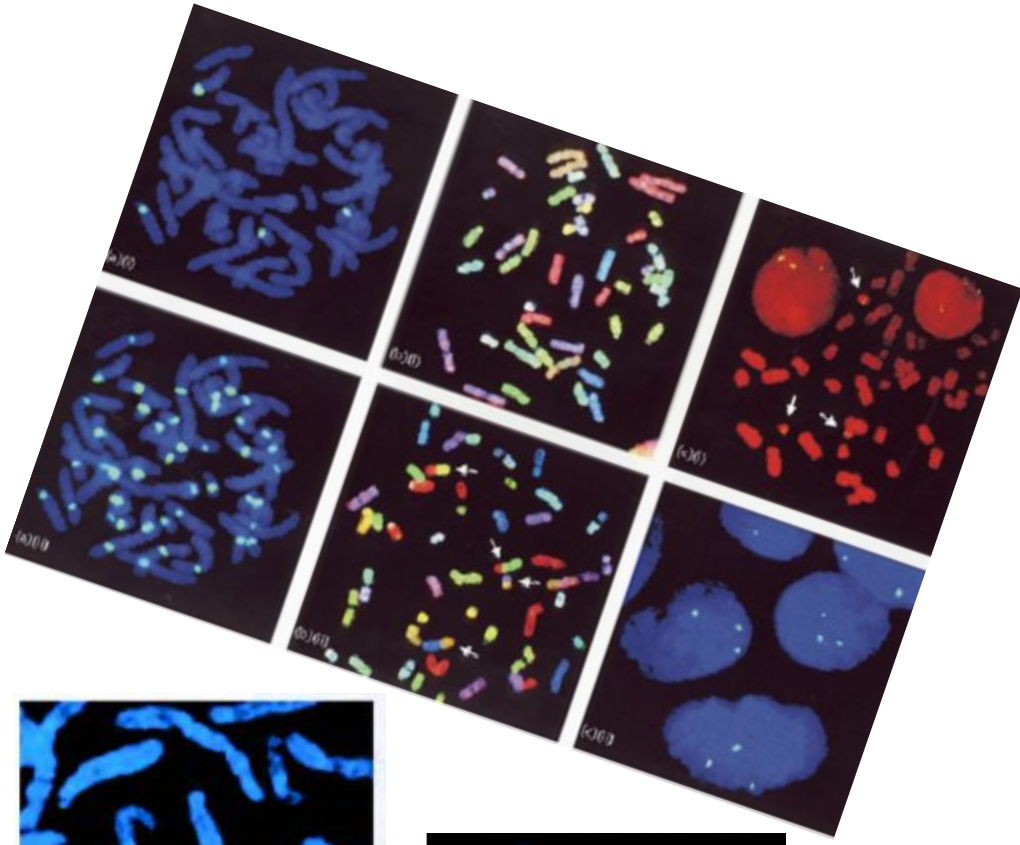
M-FISH І SKY- фарбування

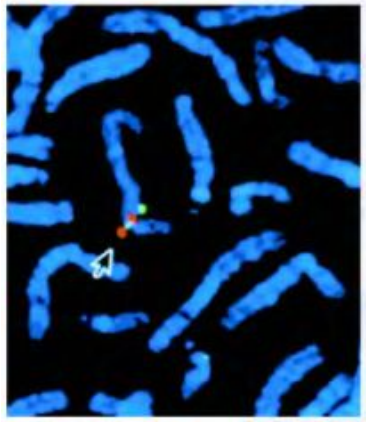
a) M-FISH-фарбування хромосом людини - 5 флуорохромів дали 24 кольори ;
b) SKY – мічені зонди хромосом людини використали для ідентифікації хромосом орангутанга;
c) M-FISH фарбування хромосом миші (8 і 11 хромосоми – трисоміки).

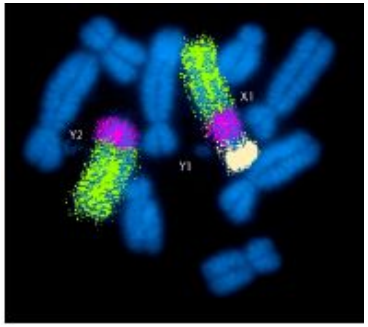
Використовуючи 5 різних барвників, можна проводити ***спектральне каріотипування***, що дозволяє відрізнити кожну з 23 пар хромосом. Застосовується для виявлення аномалій, які ушкоджують структуру багатьох хзромосом (наприклад, у ракових клітинах).

FISH – метод забарвлення хромосом: за і проти

Переваги	Недоліки
Не вимагає вирощування культури клітин	Виявляє хромосомні перебудови лише в специфічних зонду ділянках
Не вимагає використання метафазних клітин, ефективний для інтерфазних	Вимагає дотримання точних методик для приготування зразків (нічна культура інтерфазних клітин – протеаза – фіксація формальдегідом – дегідратація етанолом)
Вища чутливість методу	Вимагає перевіреку якості зонда
Дає змогу аналізувати одночасно більшу кількість клітин	Гібридизацію потрібно проводити у вологій камері при 37-42°C







Дякую за увагу!
Berloga.net