A blue scroll graphic with a white border, featuring a vertical strip on the left and a horizontal strip on the top right, both with rounded ends and a slight shadow effect.

Методика виявлення  
нуклеїнових кислот за допомогою  
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  $^{32}\text{P}$  - мічених зондів для:
  - Виявлення вірусних нуклеїнових кислот в інтерфазному ядрі
  - Хромосомоспецифічних копій
  - Локалізації специфічних мРНК
  - Транслокацій



# Картовано чимало генів людини:

- Ген легкого ланцюга імуноглобуліну X (*IGK*)
- Гени гістонів (*H1, H2A, H2B, H3, H4*)
- Гени інтерферонів  $\alpha$  і  $\beta$  (*IFL, IFF*)
- Ген інсуліну (*INS*)
- Кластер генів гормону росту (*GH*)
- та ін.



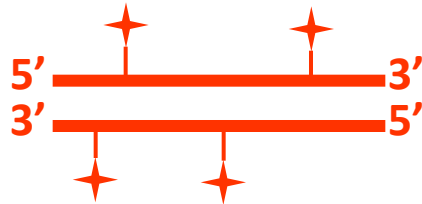
# • Вибір методики

Залежить від наступних факторів:

- Природи нуклеїнової кислоти-мішені.
  - Чутливості.
  - Специфічності.
- вартість, безпечність, наявність реактивів та обладнання.

# Принцип утворення ДНК-ДНК гібридів

Мічений ДНК-зонд



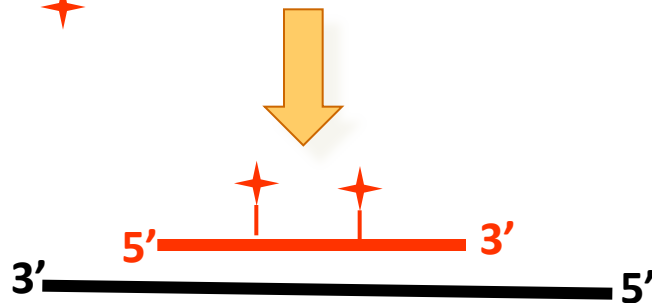
ДНК-мішень



Денатурація ДНК-зонда та ДНК-мішені



Змішування ланцюгів ДНК-зонда та ДНК-мішені

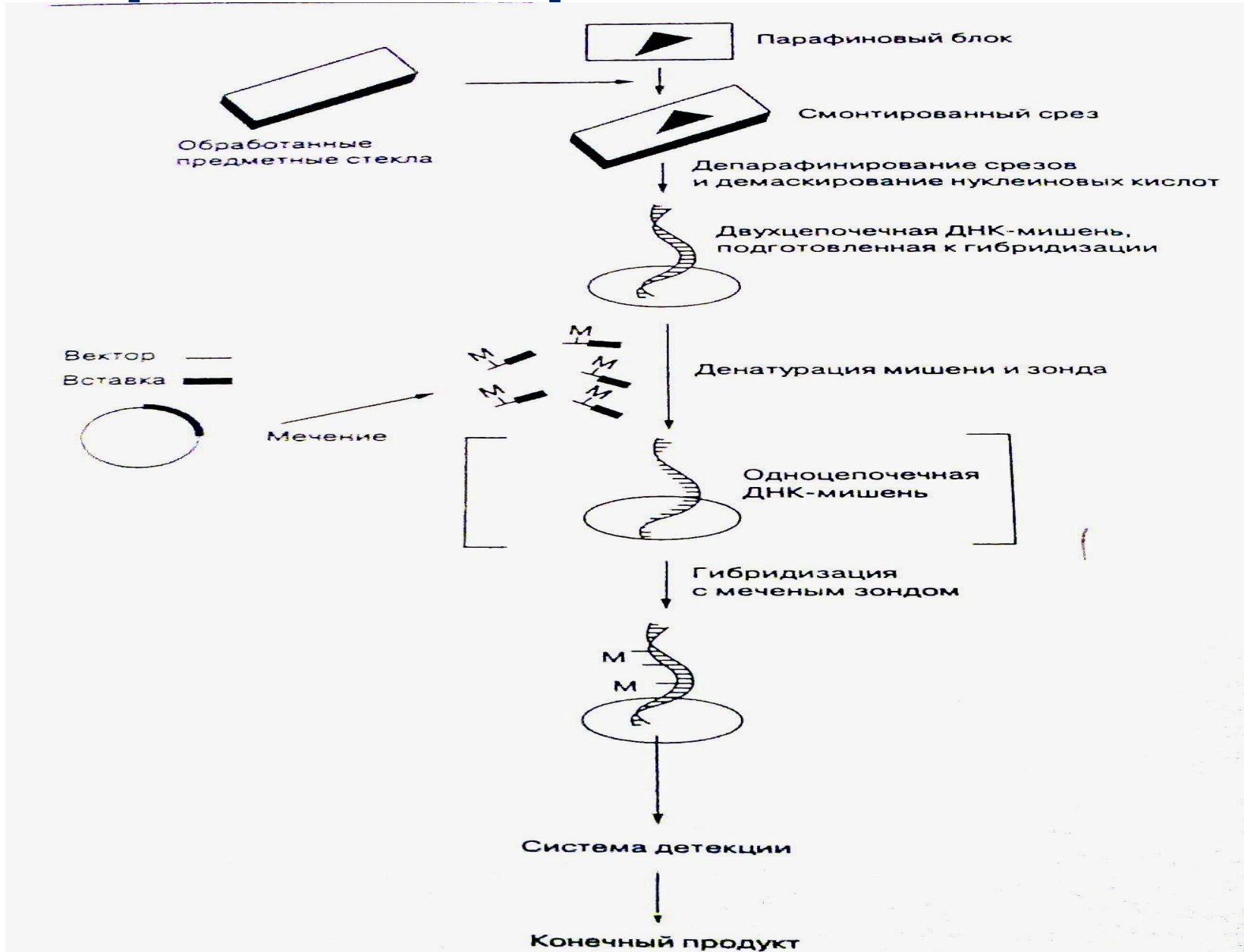


Якщо в ДНК-мішені є послідовності, комплементарні до ДНК-зонду, то утворюються молекулярні гібриди, які можна виявити завдяки мітці

- *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 гібризації *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**

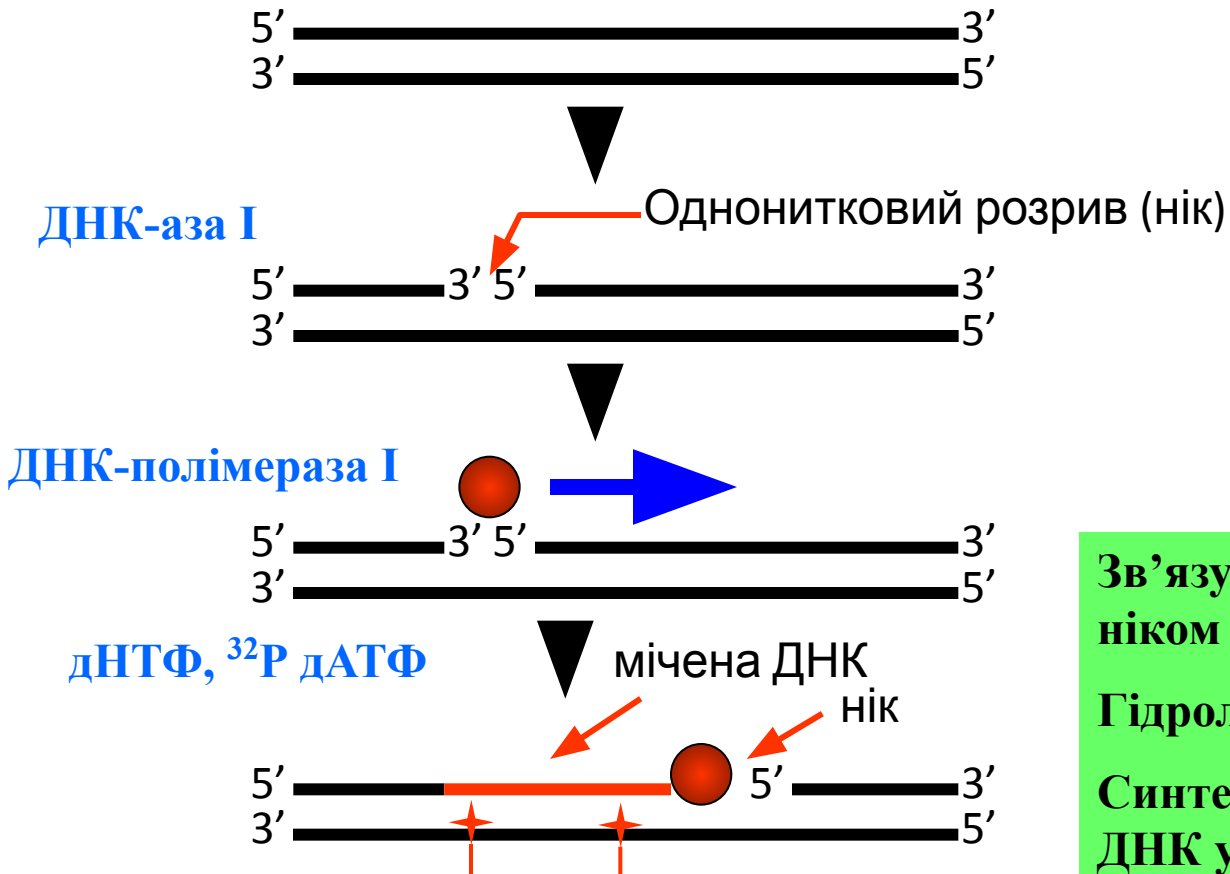
Використовуються для виявлення ДНК, проте також використовуються і для гібридизації РНК. Представляють собою бактеріальні плазмідні із вбудованою специфічною послідовністю.

*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 <sup>32</sup>Р ланцюга ДНК у напрямку 5'→3'

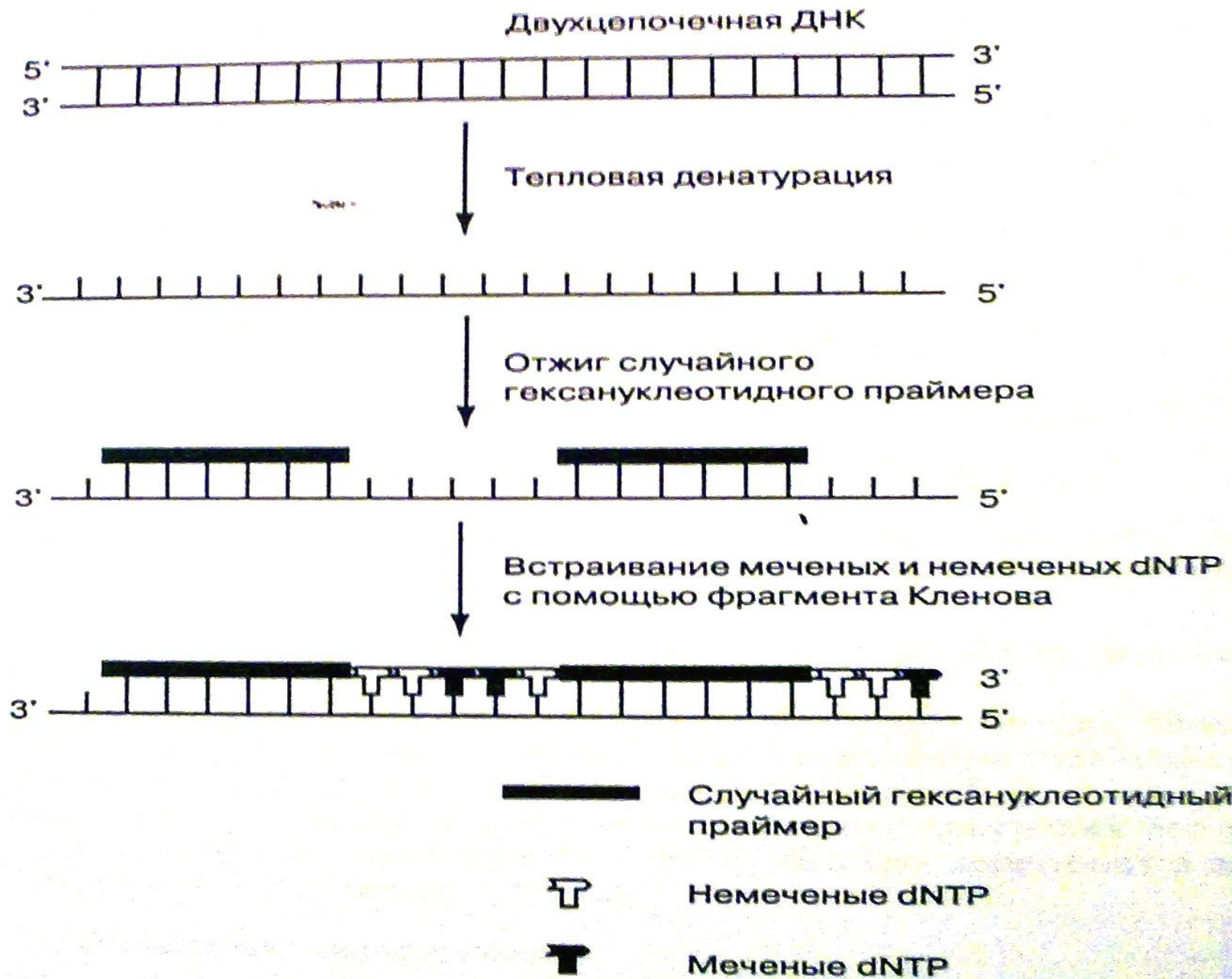


Рис. 13.3. Мечение ДНК методом рассеянной затравки.

A background image of pink cherry blossoms in full bloom, with soft, out-of-focus petals and yellow stamens. The title 'Зонди' is centered over the top half of the image.

# 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

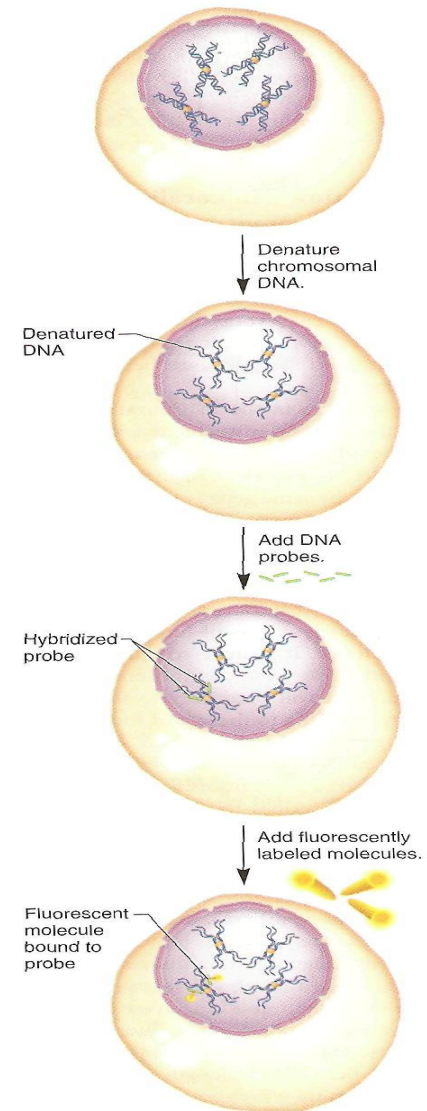
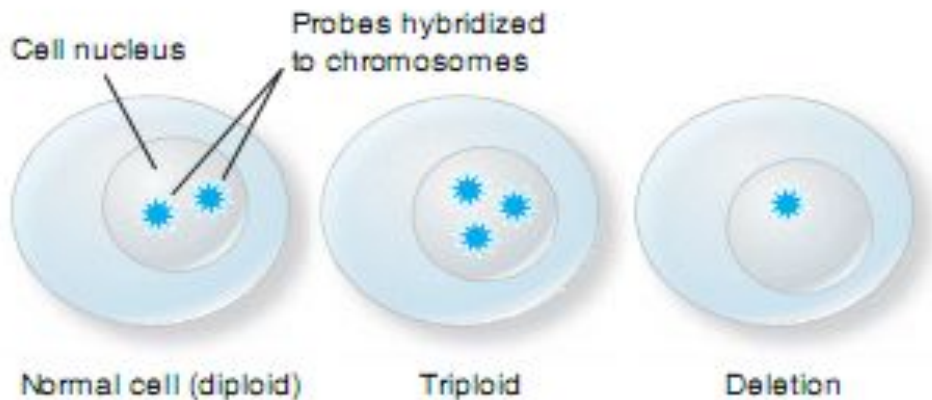
- Визначення змін кількості хромосом.
- Визначення статі дитини.
- Для діагностики захворювань та підтвердження діагнозу.
- Для детекції перебудов хромосом: делецій, дуплікацій, транслокацій, мікроперебудов.
- Для моніторингу залишкових явищ онкозахворювання після хіміотерапії і пересадки кісткового 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

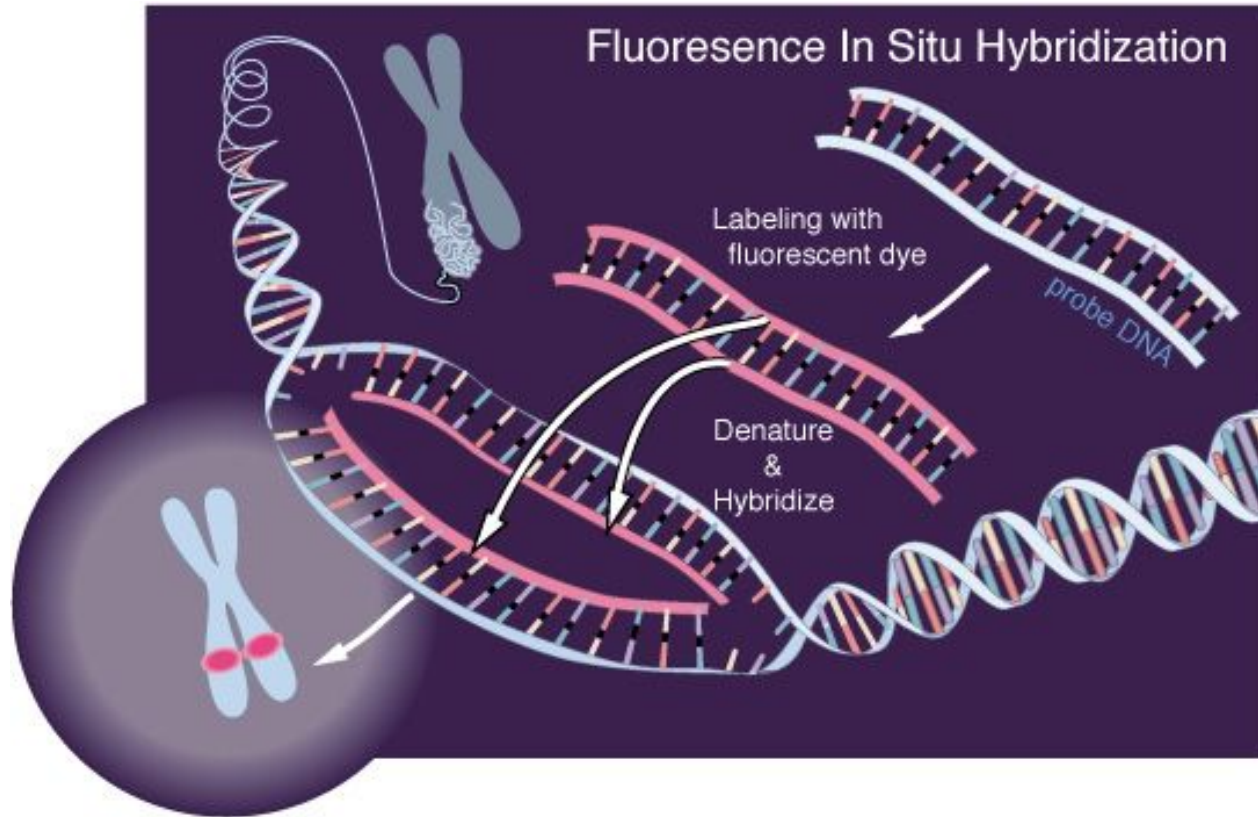
Використовується для виявлення ДНК, РНК та білків у клітині або *in situ*.

**Суть методу:** якщо у пробі наявна досліджувана ділянка, комплементарна міченому флуоресцентною 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).



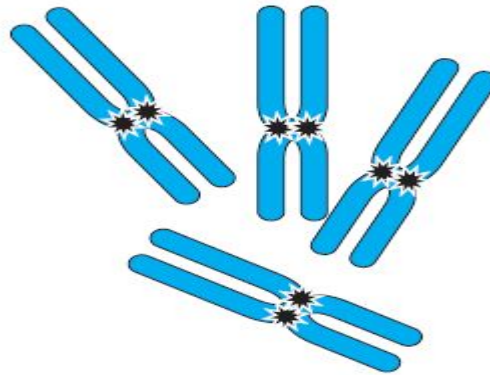
# FISH



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

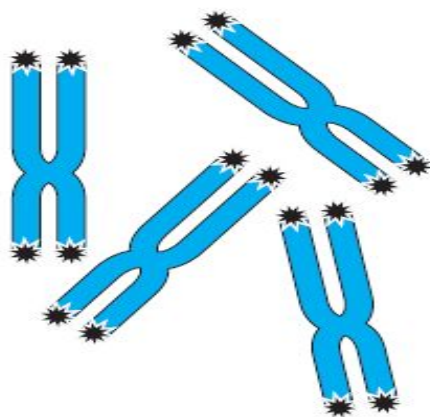
# Для FISH методу використовують такі типи зондів:

- ✓ **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

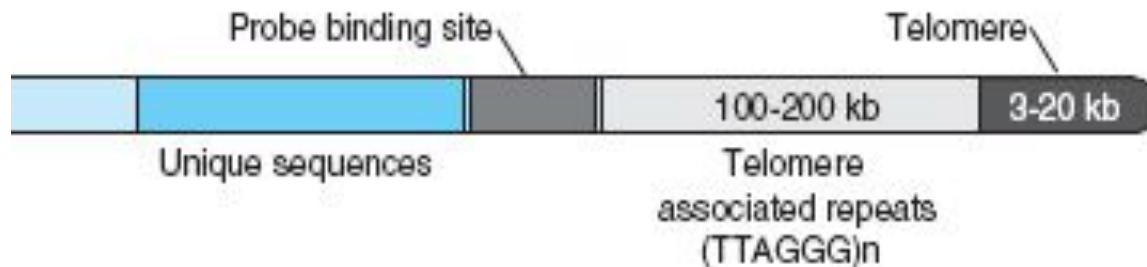


Centromeric probes

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



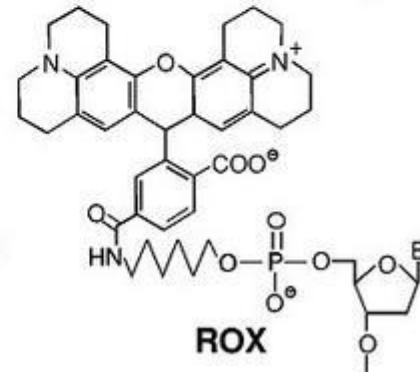
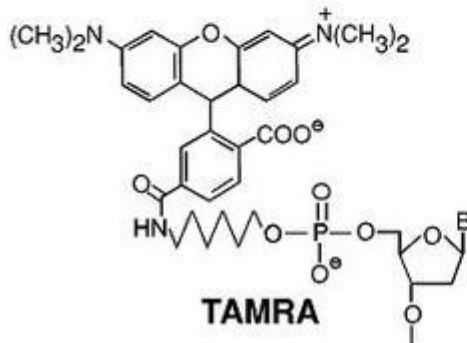
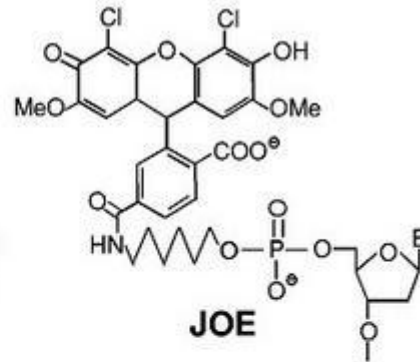
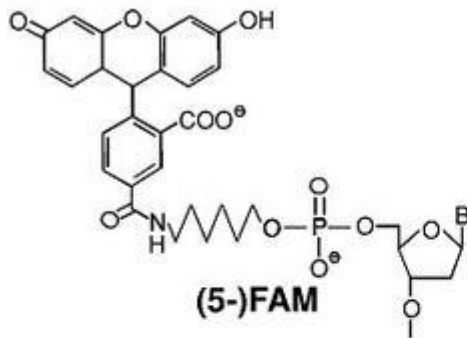
Telomeric probes



✓ **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.



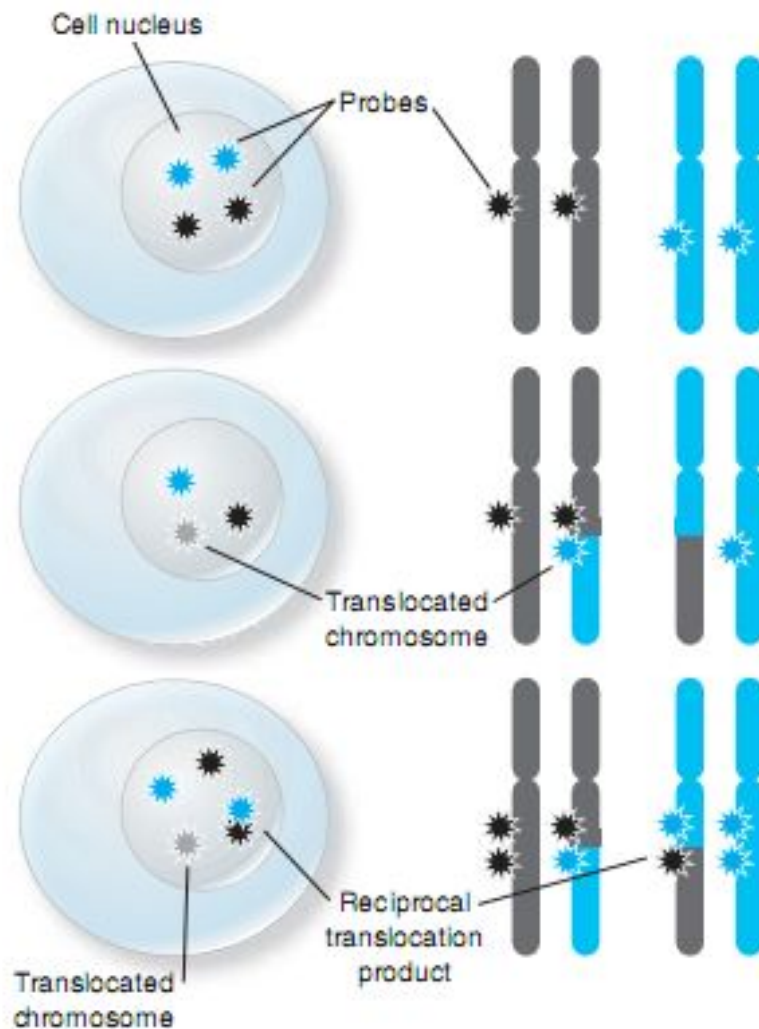
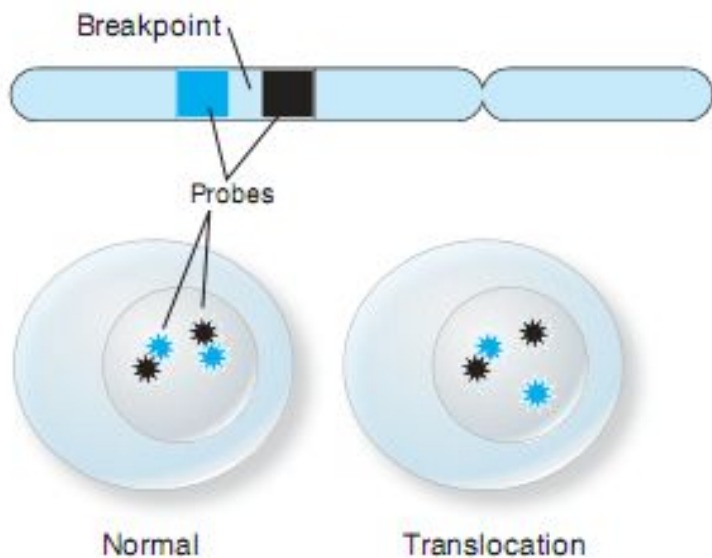
# Флуоресцентні мітки ДНК



- ❑ 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)

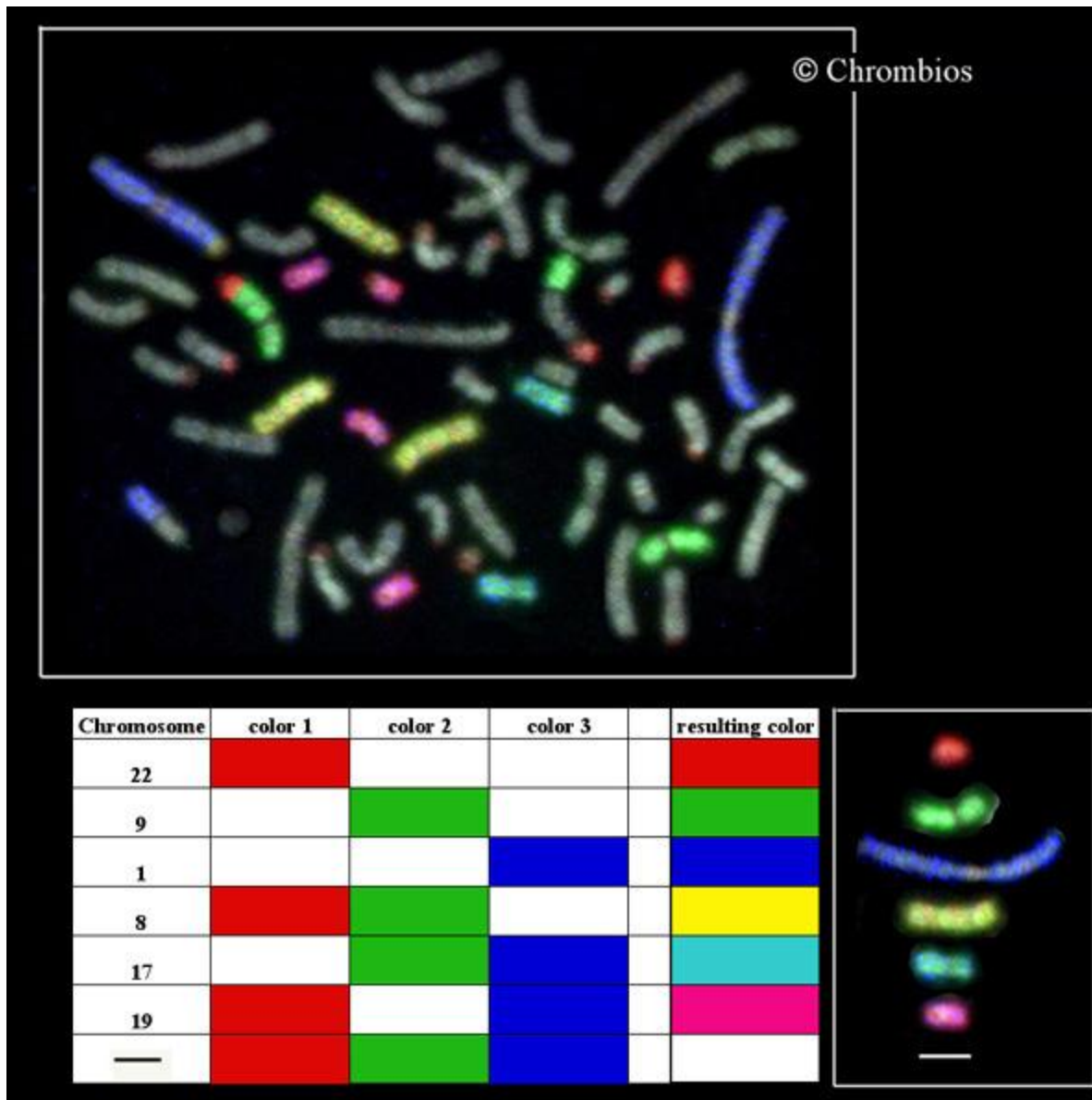
Базується на порівнянні тестованої та нормальної ДНК, мічених різними флюорохромами, які змішуються в пропорції 1:1 та гібридизуються на метафазних хромосомах каріотипово здорової людини. Потім знімається серія зображень одного і того ж поля зору з використанням різних фільтрів.

## **ПЕРЕВАГИ:**

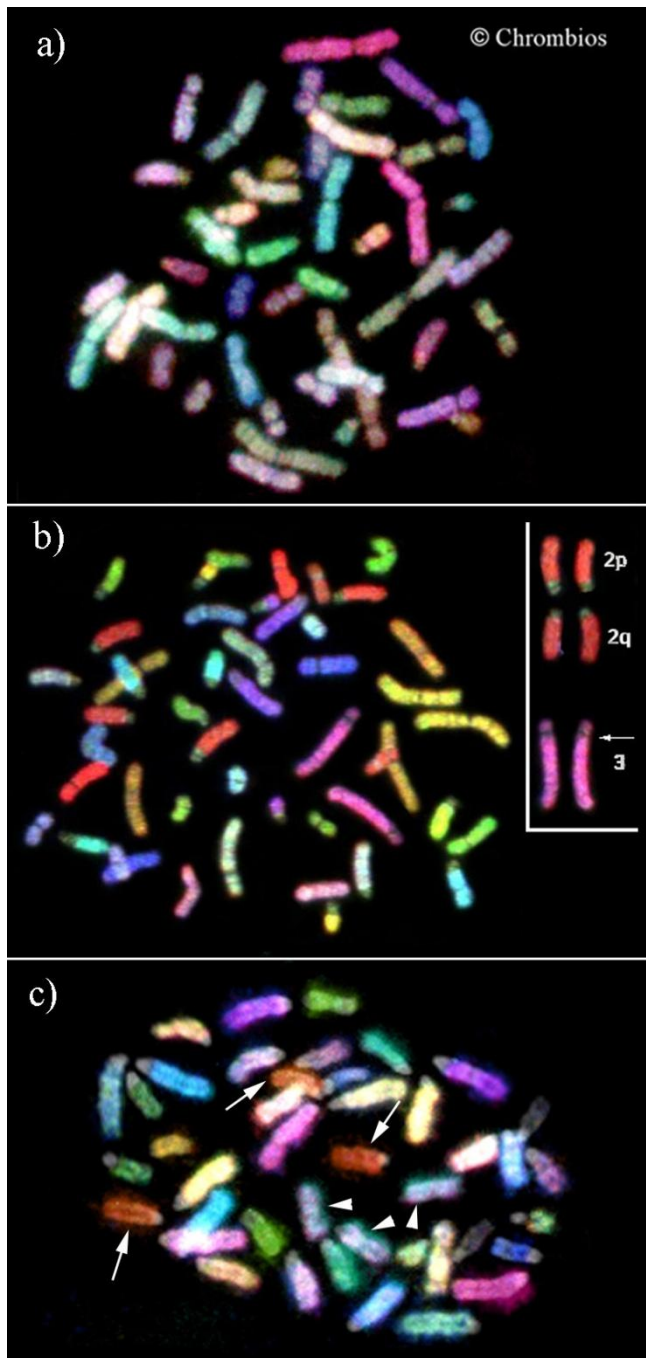
- 1) не залежить від джерела досліджуваного матеріалу і може бути проведена з невеликою кількістю ДНК, включаючи архівний матеріал;**
- 2) можна провести повний аналіз структурних аномалій в хромосомах всього геному за один раз;**
- 3) не потребує виготовлення препаратів метафазних хромосом з досліджуваної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

# FISH-метод

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



# М-FISH I SKY- фарбування



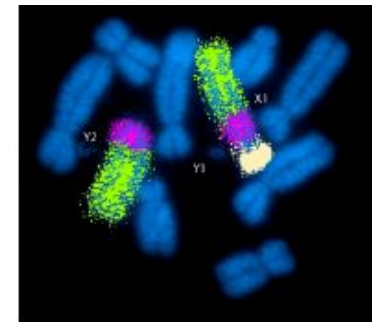
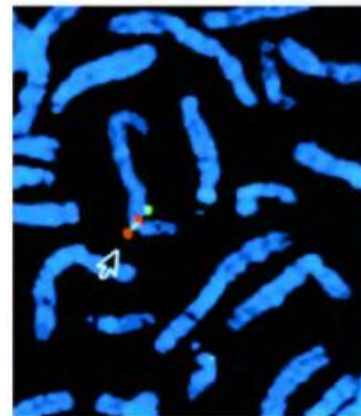
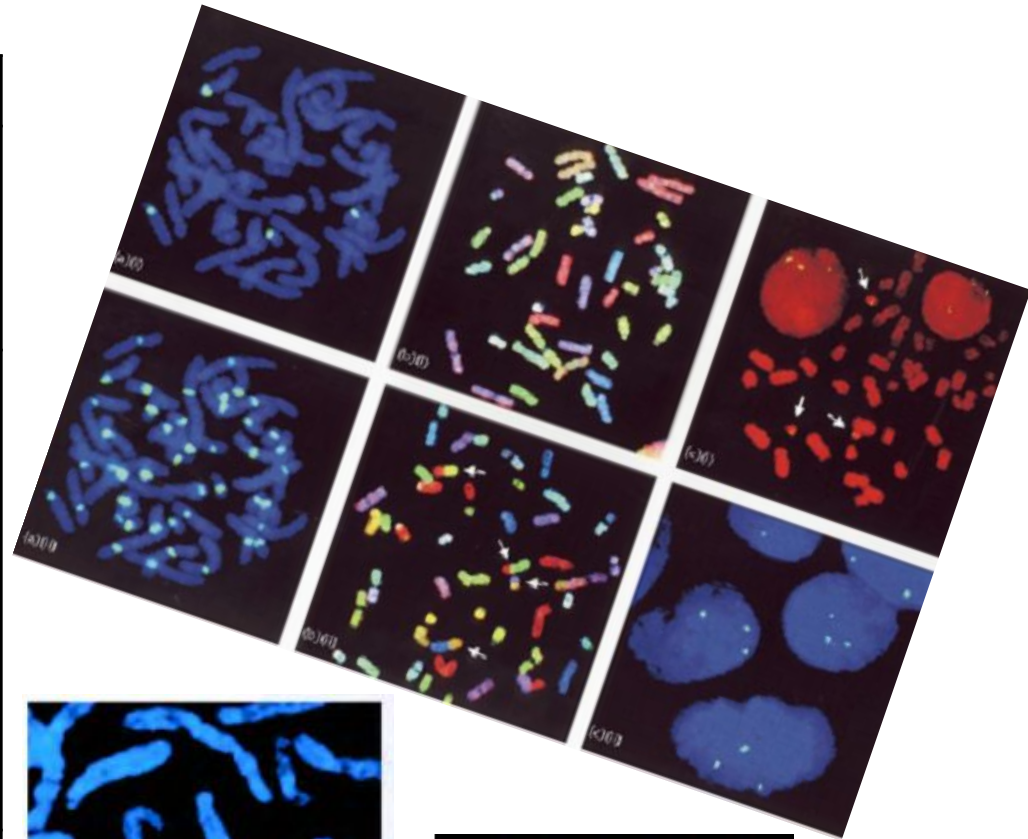
- a) M-FISH-фарбування хромосом людини - 5 флуорохромів дали 24 кольори ;
- b) SKY – мічені зонди хромосом людини використали для ідентифікації хромосом орангутанга;
- c) M-FISH фарбування хромосом миші (8 і 11 хромосоми – трисоміки).

Використовуючи 5 різних барвників, можна проводити *спектральне каріотипування*, що дозволяє відрізнити кожну з 23 пар хромосом. Застосовується для виявлення аномалій, які ушкоджують структуру багатьох хромосом (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 перевірку якості зонда
Дає змогу аналізувати одночасно більшу кількість клітин	Гібридизацію потрібно проводити у вологій камері при 37-42°C



The image features two large, vibrant purple flowers with dark centers, set against a solid purple background. The text 'Дякую за увагу!' is written in a bold, stylized font across the middle of the image, with a white outline and a slight shadow effect.

**Дякую за увагу!**