FISH - флуоресцентная in situ гибридизация

Работу подготовила
студентка 537 группы
Светлакова Екатерина Олеговна

- FISH – это цитогенетический метод.
- Цитогенетический метод – это изучение генетической конституции клеток человека с помощью визуализации и анализа хромосом.

- Гибридизация in situ – метод прямого выявления нуклеиновых кислот в клеточных структурах в условиях, позволяющих одновременно исследовать их морфологию.
- Видны изменения в хромосомах не в пробирке, а непосредственно на гистологическом срезе.

По методу выявления:

- Флуоресцентная
- Хромогенная

Применение

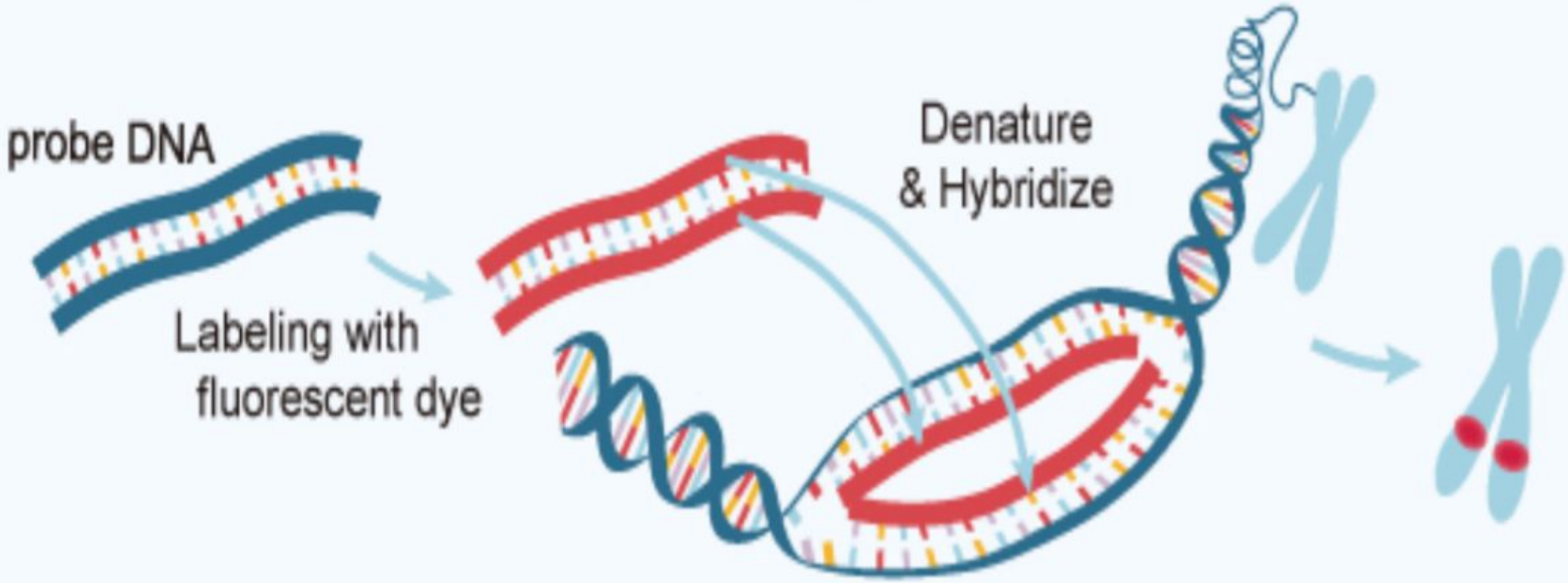
Предимплантационная генетическая диагностика	Пренатальная диагностика	Постнатальная диагностика
• Предимплантационный генетический скрининг (определение анеуплоидий хромосом 13,15,16,17,18,21,22,X,Y) • Предимплантационная генетическая диагностика (исследование дериватных хромосом у носителей хромосомных перестроек)	• Скрининг основных анеуплоидий некультивированных клеток амниотической жидкости • Уточнение/верификация результатов стандартного цитогенетического исследования	• Уточнение/верификация результатов стандартного цитогенетического исследования • Скрининг анеуплоидий сперматозоидов • Исследование сегрегации хромосом у носителей структурных перестроек • Исследование природы маркерных хромосом • Исключение сложных перестроек - тройных и более сложных транслокаций, инсерций • Исследование хромосомных перестроек в онкогематологии • Диагностика солидных опухолей

Принцип FISH-метода

- В основе **FISH-метода** лежит реакция гибридизации между искусственно созданным ДНК-зондом и комплементарной ему нуклеотидной последовательностью ядерной ДНК.
- Молекула ДНК представляет собой две спирально соединенные нуклеотидные цепи, а гибридизация возможна только в том случае, если цепи разойдутся. Чтобы разъединить нуклеотидные цепи ДНК прибегают к денатурации. После денатурации ДНК-зонд гибридизируется с комплементарной ему нуклеотидной последовательностью и может быть обнаружен при помощи флуоресцентного микроскопа.

- ДНК-пробы представляют собой специально синтезированные фрагменты ДНК, последовательность которых комплементарна последовательности ДНК исследуемых аберрантных хромосом.

Fluoresence In Situ Hybridization



Интерпретация результатов

- В ходе процесса гибридизации при наличии в исследуемом образце аберрантных хромосом происходит их связывание с ДНК-пробой, которое при исследовании с помощью флуоресцентного микроскопа определяется как флуоресцентный сигнал (положительный результат FISH-теста).
- При отсутствии аберрантных хромосом несвязанные ДНК-пробы в ходе реакции "отмываются", что при исследовании с помощью флуоресцентного микроскопа определяется как отсутствие флуоресцентного сигнала (отрицательный результат FISH-теста).

Преимущества FISH

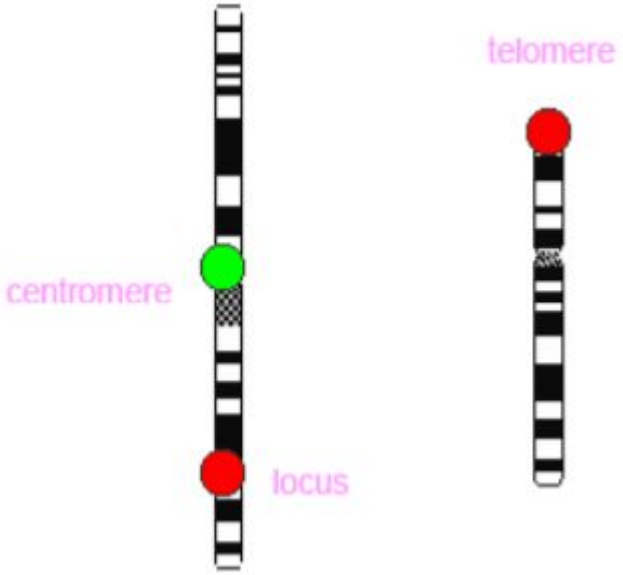
- Эффективность, быстрота и относительная простота метода относительная простота метода FISH делают его полезным инструментом для диагностики хромосомных аномалий как в постнатальном , так и в пренатальном периоде, включая предимплантационный.

Недостатки

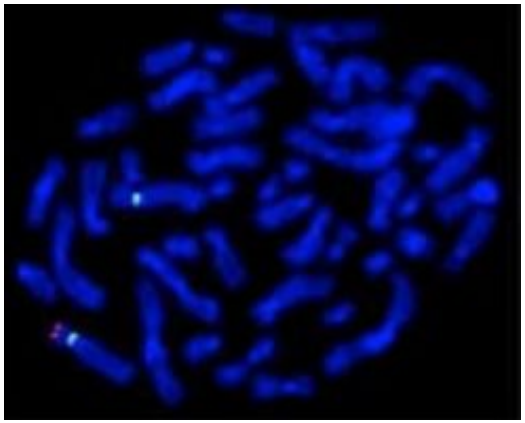
- Зонды являются специфичными только к одному участку генома и, как следствие, при одном исследовании можно определить наличие или число копий только этого участка (или нескольких при использовании многоцветных зондов). Поэтому важным является правильная клинически предпосылка, а FISH анализ может только подтвердить или не подтвердить диагноз.

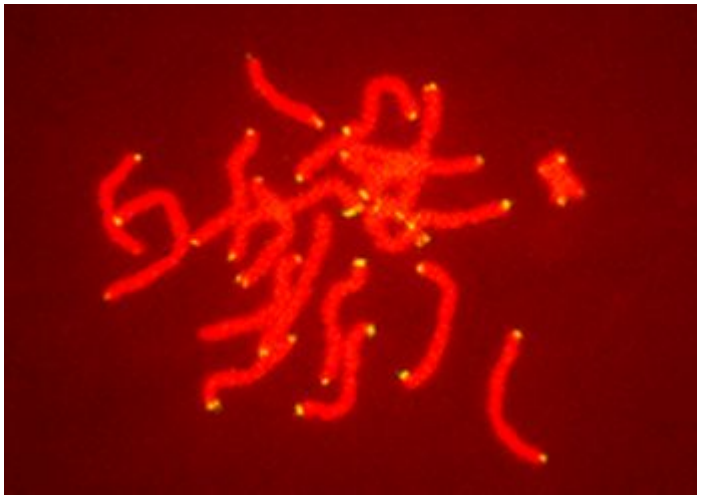
Типы проб для FISH

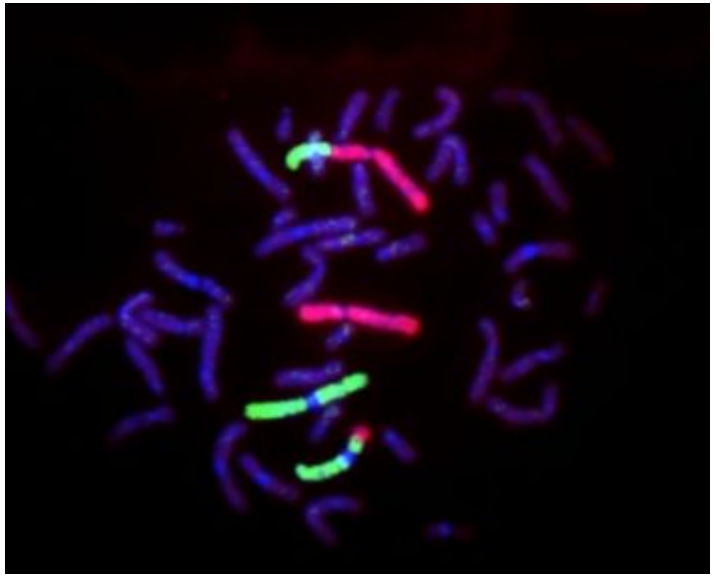
- Центромерные
- Теломерные
- Пробы на всю хромосому
- Локус-специфические

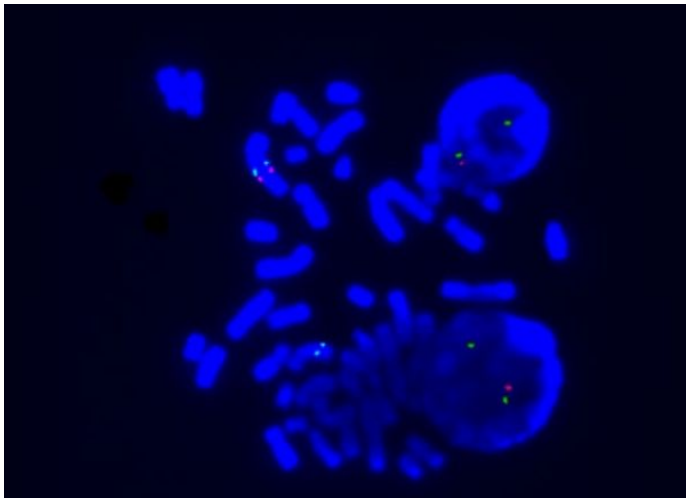


Примеры положительных результатов









Хромосомные перестройки у супружеских пар с бесплодием

- Транслокации – наиболее частые структурные хромосомные перестройки, определяемые у супружеских пар с бесплодием, поскольку фенотипически не проявляются у носителей.
- В мейозе I дериватные хромосомы и их нормальные гомологи могут среагировать с образованием несбалансированных гамет

Последствия:

- Бесплодие
- Невынашивание
- Мертворождение или ранняя детская смертность
- Рождение детей с Рождение детей с хромосомными аномалиями

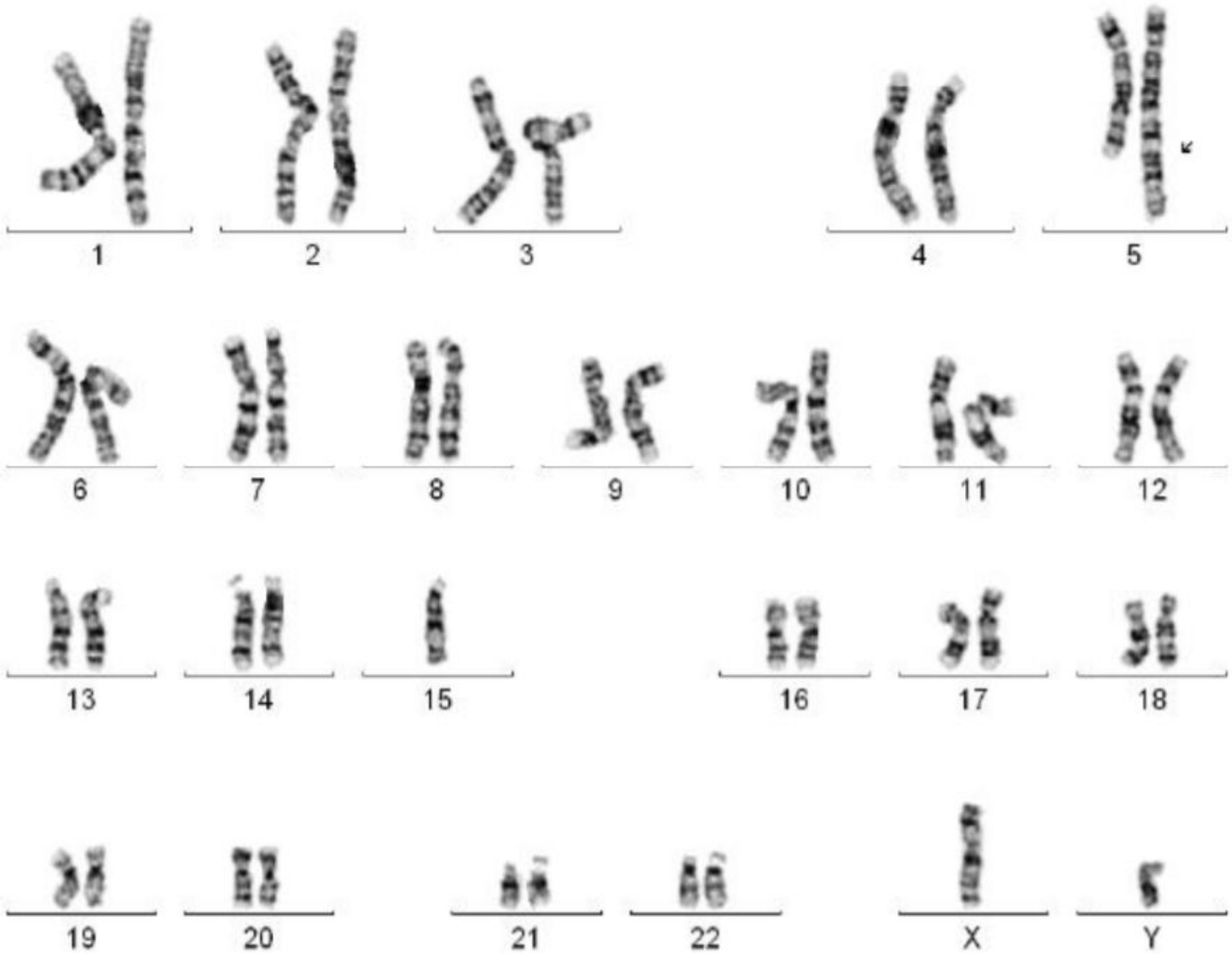
Клинический пример

- Пациент 1970 г.р.
- Олигоастенотератозооспермия
- У супружеской пары одно спонтанное прерывание беременности в 12 нед.

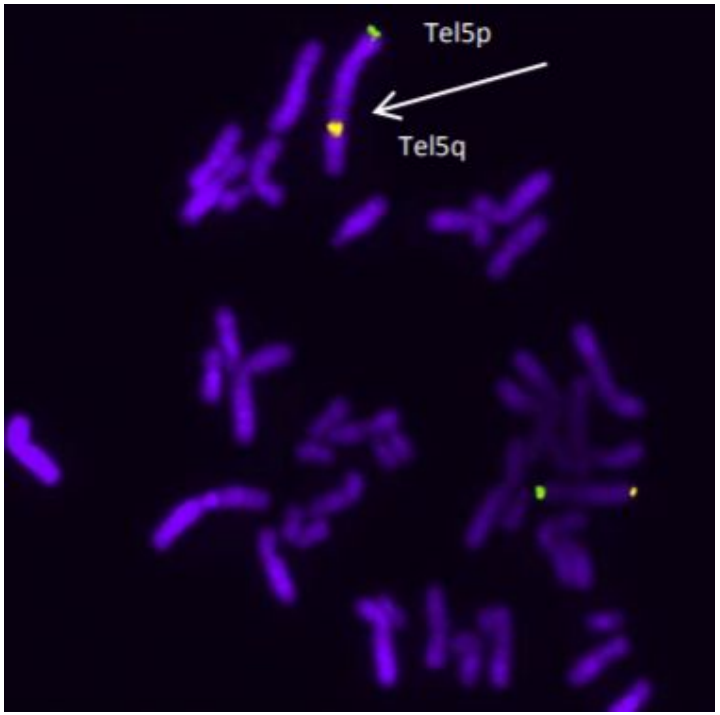
Система описания хромосом

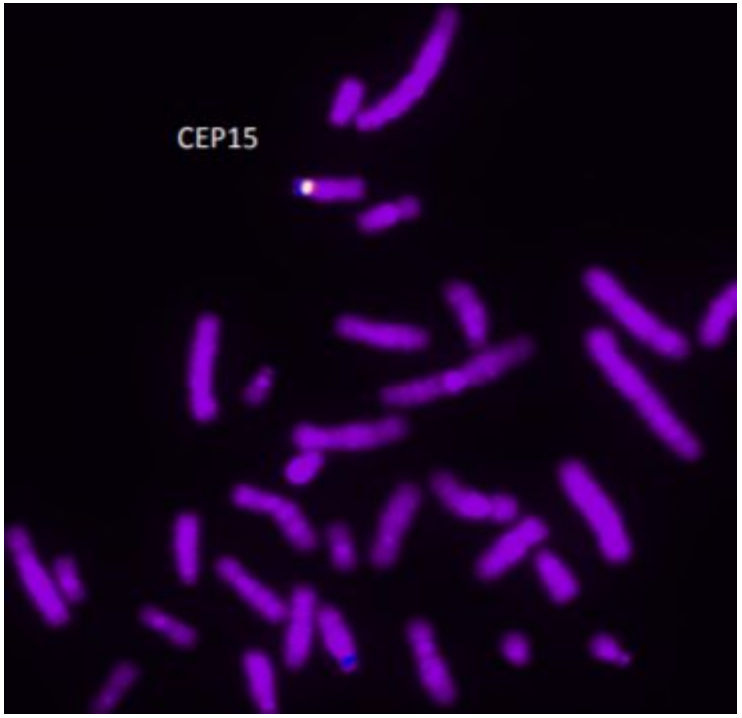
- – Короткое плечо хромосом обозначают латинской буквой p, длинное – q.
- – Каждое плечо хромосомы разделяют на районы, нумеруемые от центромеры к теломере.
- Если локализация гена точно известна, для ее обозначения используют индекс полосы. Например, обозначается 13p14 – четвертый сегмент первого района короткого плеча хромосомы 13

45,XY,der(5;15)



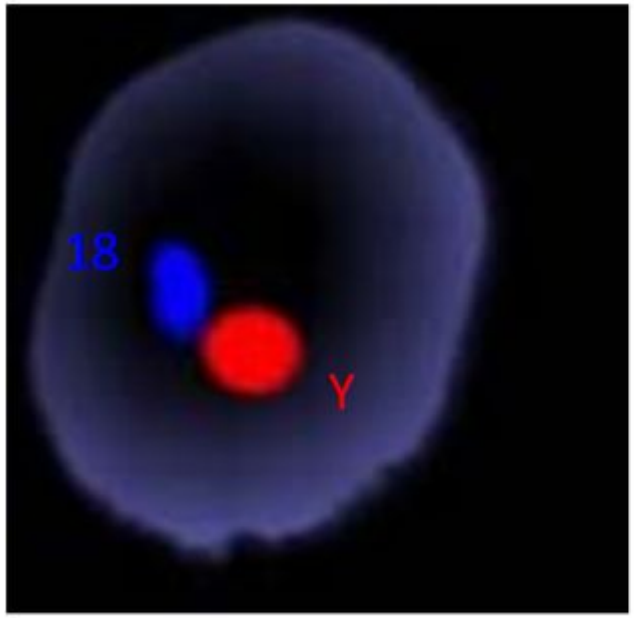
кариотипирование с использованием метода FISH



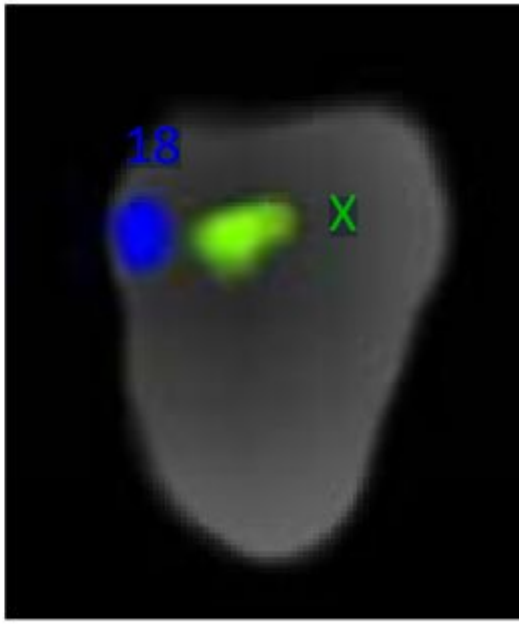


- 45,ХУ,der(5;15)t(q35.3; q10)

Использование метода FISH для исследования уровня анеуплоидий сперматозоидов.

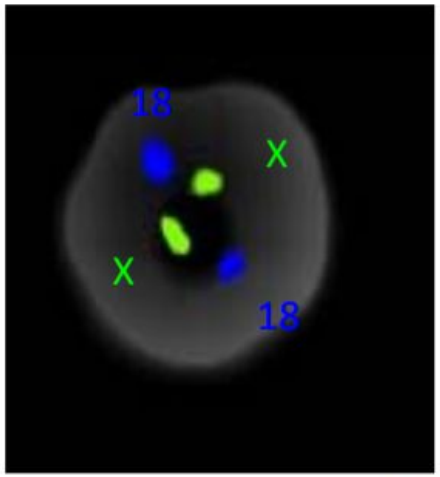


Y- несущий сперматозоид

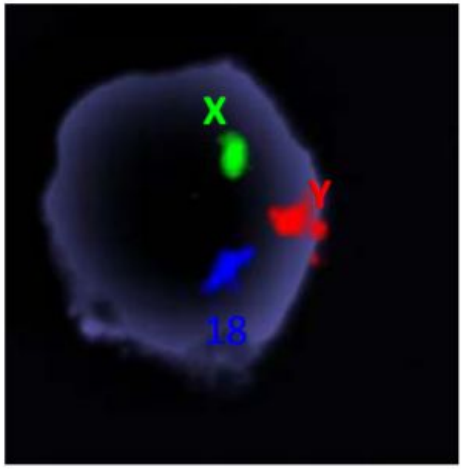


X – несущий сперматозоид

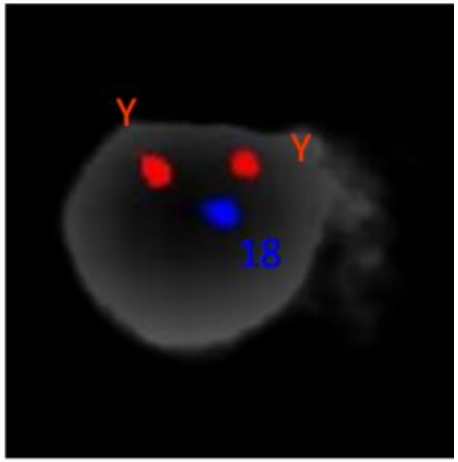
Анеуплоидные сперматозоиды



Дисомия хромосом 18,X



18,X,Y



18,Y,Y

Спасибо за внимание!
Будьте здоровы!