

Реферат на тему:
“Флуоресцентная гибридизация. Метод FISH.”

Нестеров Анатолий Сергеевич,

Второй курс ФБМФ, группа Б06-106

История

Флуоресцентная гибридизация *in situ* – это комбинация методов цитогенетики и молекулярной генетики. Принцип метода FISH заключается в гибридизации – связывании ДНК-зонда с хромосомной ДНК исследуемого образца пациента. Зонд представляет собой небольшой фрагмент ДНК, помеченный флуоресцентным красителем, который связывается с определенным участком хромосомы. Далее образцы исследуются с помощью флуоресцентной микроскопии при использовании подходящих для зондов светофильтров

До недавнего времени FISH была ограничена аппаратным и программным обеспечением, реагентами, технологией получения красителей и высокой стоимостью исполнения. Серийно выпускаемые аппаратные средства для микроскопов, оптимизированные для многоцветной FISH, были недоступны до середины 1990-х годов. До этого микроскопы приходилось специально настраивать для приложений FISH. Большинство микроскопической оптики не было предназначено для обнаружения световых сигналов низкого уровня, характерных для FISH. Поскольку при использовании этого метода существенно улучшилось разрешение геномов, возросли и требования к микроскопической оптике. Представляли проблему и хроматические аберрации на многих длинах волн. Для многоцветного анализа в особенности, все линзы, включая собирающую линзу, должны были иметь коррекцию хроматических аберраций. К тому же, очень трудно было настраивать эпифлуоресцентные источники света для получения равномерного освещения.

Однако в настоящее время применение FISH стремительно растет в геномике, цитогенетике, пренатальных исследованиях, биологии новообразований, радиоактивном маркировании, геном картировании, амплификации генов и основных биомедицинских исследованиях. FISH позволяет достигать очень высокого пространственного разрешения морфологических и геномных структур. Этот метод довольно быстрый, простой в осуществлении и характеризуется высокой стабильностью красителей. В зависимости от используемого зонда можно определить геном отдельной особи, целые хромосомы, участки хромосом и последовательности уникальных копий.

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 (для последующей гибридизации денатурированной должна быть как ДНК в ядрах исследуемого образца, так и сам ДНК-зонд). После денатурации ДНК-зонд гибридизуется с комплементарной ему нуклеотидной последовательностью и может быть обнаружен при помощи флуоресцентного микроскопа.

Таким образом, общий вид протокола для постановки FISH можно представить в следующем виде:

1. Подготовка гистологического или цитологического препарата

Подготовка гистологического препарата осуществляется по стандартной схеме: вырезка, маркировка, проводка, заливка, микротомия, помещение среза на предметное стекло и депарафинизация. При подготовке цитологического препарата используются специальные осаждающие растворы и центрифугирование, что позволяет получить концентрированную суспензию клеток.

2. Предварительная обработка

Препарат обрабатывается протеазами, чтобы исключить присутствие белков, которые затрудняют гибридизацию.

3. Нанесение ДНК-зонда на препарат и последующая денатурация

Для того, чтобы денатурировать зонд и ДНК образца, их обрабатывают формамидом и нагревают до температуры около 85-90°C.

4. Гибридизация

После денатурации препарат охлаждают до определенной температуры (37°C в случае клинических исследований) и инкубируют во влажной камере в течение нескольких часов (продолжительность инкубации указана в каждом конкретном протоколе). В настоящее время для денатурации и гибридизации используют автоматические гибридайзеры.

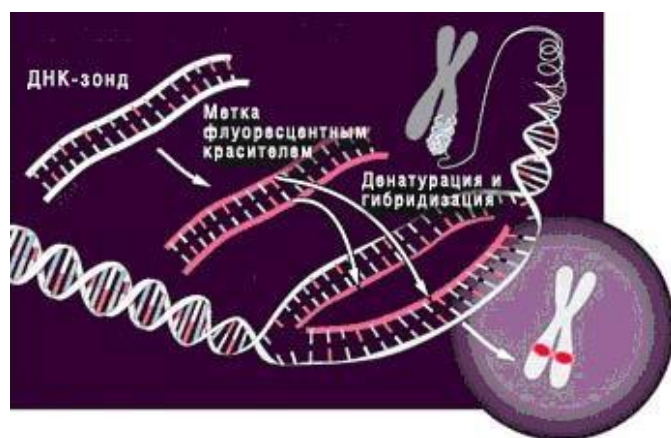
5. Промывка

После того, как гибридизация завершена, необходимо отмыть несвязавшиеся зонды, которые, в противном случае, создадут фон, затрудняющий оценку результатов FISH-анализа. Для промывки обычно используют раствор, содержащий цитрат и хлорид натрия (SSC).

6. Контр-окрашивание

При помощи флуоресцентных красителей (DAPI - 4,6-диамидин-2-фенилиндола; йодид пропидия) проводится окраска всей ядерной ДНК.

7. Анализ результатов при помощи флуоресцентного микроскопа



ДНК - зонды

FISH может применяться для различных целей с использованием зондов трех различных типов:

1. *Цельно хромосомные зонды* — Whole Chromosome Painting (WCP). Они представляют собой набор фрагментов ДНК, равномерно покрывающих какую-либо хромосому вдоль всей ее длины или только часть ее от короткого или длинного плеча до меньших регионов. Они гибридизируются на обоих хромосомных гомологах и используются только на метафазных хромосомах, выявляя хромосомные перестройки (транслокации и др.) различной сложности.

2. *Зонды, состоящие из повторяющихся последовательностей ДНК*

2а. *Центромерные зонды* – с их помощью каждая хромосома может быть окрашена в уникальный цвет, что позволяет оценить их количество и, в случае отклонений от нормального значения, диагностировать связанные заболевания.

2б. *Субтеломерные (теломерные) зонды* — SubTel. Теломеры представляют собой окончания эукариотических хромосом и имеют значение для их защиты, репликации и стабилизации. Они составлены из коротких tandemных повторов ДНК и высоко консервативны: у всех позвоночных это одна и та же простая последовательность (TTAGGG)_n. Теломеры играют важную роль в старении клеток и их раковом перерождении. Продвинутое системы идентификации позволяют количественно оценивать флуоресцентный сигнал от них. 3. *Локус-специфические зонды* — Locus Specific Identifier (LSI). Данные пробы специфичны для определенных хромосомных участков, позволяя оценивать наличие или отсутствие копий нормальных и патологических генов

Материалы для исследования

Для FISH используются цитогенетические препараты лимфоцитов периферической крови, фибробластов, клеток буккального эпителия, амниотической жидкости, ворсин хориона или плаценты. Взятие образцов биологического материала и культивирование клеток выполняется по стандартным методикам. Меченные флуоресцентными метками специфические ДНК-зонды гибридизуются с хромосомной ДНК, причем можно одновременно использовать множественные зонды к разным локусам.

FISH является полезным и чувствительным методом цитогенетического анализа при выявлении количественных и качественных хромосомных aberrаций, таких транслокации, удвоение и анеуплоидия.

FISH на интерфазных хромосомах служит быстрым методом пренатальной диагностики трисомий по 21, 18 или 13 хромосомам или aberrаций половых хромосом. В онкологии с помощью FISH можно выявлять ряд транслокаций (bcr/abl, MLL, PML/RARA, TEL/AML1), связанных с гематологическими злокачественными новообразованиями.

Метод может использоваться для мониторинга остаточных явлений онкозаболеваний после химиотерапии и пересадки костного мозга и выявления усиленных онкогенов (с-мус/п-мус), связанных с неблагоприятным прогнозом в отношении некоторых опухолей.

FISH также используется для контроля приживаемости аллотрансплантата костного мозга, полученного от индивида противоположного пола.

FISH является чувствительным методом для идентификации хромосомных aberrаций и одномоментного быстрого анализа большого (>500) числа клеток. Метод обладает высокой точностью при идентификации природы хромосом и неизвестных фрагментов хромосомной ДНК.

Однако, флуоресцентная гибридизация *in situ* имеет один существенный недостаток. 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 клиническая предпосылка, а FISH анализ может только подтвердить или не подтвердить диагноз. В последнем случае анализ приходится повторять в отношении сходных синдромов и это далеко не всегда приносит желаемый результат.

Альтернативой этому методу является хромосомный микроматричный анализ, который при такой же точности, чувствительности и специфичности определяет количество генетического материала в сотнях тысяч (и даже миллионах) точек генома, что дает возможность диагностики практически всех известных микроделеционных и микродупликационных синдромов.

Для создания ДНК проб используют клонированные последовательности ДНК, геномную ДНК, продукты ПЦР-реакции, меченые олигонуклеотиды, а также ДНК, полученную при помощи микродиссекции. Мечение зонда может осуществляться разными способами, например, путем ник-трансляции или при помощи ПЦР с мечеными нуклеотидами.

Процедура гибридизации

На начальном этапе происходит создание зондов. Чтобы гибридизация происходила по специфическому сайту, размеры зонда должны быть достаточно большими, но и не более 1 тыс п.о, чтобы не препятствовать процессу гибридизации.

Далее, необходимо заблокировать гибридизацию ДНК-проб с неуникальными повторяющимися ДНК-последовательностями путём добавления в гибридизационную смесь немеченой ДНК повторов (например, Cot-1 DNA) при выявлении специфических локусов или при окраске целых хромосом. В случае если ДНК-зонд представляет двуцепочечную ДНК, то её необходимо денатурировать перед гибридизацией.

Следующий этап подразумевает приготовление препаратов интерфазных ядер или метафазных хромосом. Клетки фиксируют на субстрате (в большинстве случаев, на предметном стекле), далее производят денатурацию ДНК проводят

в присутствии формамида, что позволяет снизить температуру денатурации до 70° и сохранить морфологии хромосом или ядер.

Затем, добавив к препарату зонды, осуществляют гибридизацию около 12 часов. Далее для удаления всех негибридизовавшихся зондов проводят несколько стадий отмывок.

С помощью флуоресцентного микроскопа проводится визуализация связавшихся ДНК-зондов. Интенсивность флуоресцентного сигнала варьируется исходя из множества факторов — эффективности мечения зондом, типа зонда и флуоресцентного красителя. Различные изменения в генотипе родителей, которые ведут к нарушению репродукции и невозможности зачатия ребенка естественным путем, могут передаваться будущему потомству при применении вспомогательных репродуктивных технологий, что указывает на необходимость проведения предимплантационной генетической диагностики родителей для профилактики рождения больного ребенка перед проведением программы ВРТ.

С использованием любых клинических или исследовательских микроскопов, обладающих возможностью получения флуоресцентных изображений (например, Olympus, Zeiss), можно применять метод FISH.

Несмотря на возможность получения и анализа изображений вручную, программное обеспечение, позволяющее анализировать изображения, в сочетании с автоматизированной микроскопией увеличит эффективность и точность результатов и применяется достаточно часто. Автоматизация метода FISH и развитие сравнительной геномной гибридизации ведут к улучшению качества и эффективности диагностики и способствуют развитию репродуктивной и перинатальной медицины.

Приборы и реагенты для FISH – анализа

Методы FISH-диагностики широко используются в исследованиях хромосомных аномалий в интерфазных ядрах. Это немаловажно с прикладной стороны, потому что данный метод затрачивает достаточно мало времени и экономических ресурсов. К примеру, у пациента или плода есть дисомия по 21-й хромосоме. В таком случае, в норме, будут видны две флуоресцирующие цветные точки, а при трисомии хромосомы 21, т.е. при синдроме Дауна, будут видны три точки.

Также, было выявлено повышение верификации хромосомных болезней благодаря методам молекулярной цитогенетики. Доля невыявленных случаев составляла 10 % при использовании обычных цитогенетических анализов, но при внедрении FISH-технологий - снизилась до 0,9-1,5 %. Основой исследования хромосомных синдромов является использование различных типов ДНК-зондов, которые позволяют маркировать индивидуальные хромосомы или их участки.

Также, созданы специальные библиотеки хромосомо специфических участков ДНК для успешного прикладного использования данных методов. В последние несколько лет, ДНК-зонды стали помечать различными цветами, что иногда называют “цветными” FISH-технологиями. Это дает возможность повысить качество анализа и проанализировать

количественные и структурные перестройки хромосом, а также проводить экспресс-диагностику, что особенно важно для пренатальной диагностики.

Кроме обычного использования конкретного набора CEP и LSI зондов в клинической диагностике, есть более изощренные способы постановки FISH, применяющиеся в работах исследовательского характера. Впрочем, есть вероятность, что в скором времени их станут широко применять и в клинических целях.

В целях изучения опухолевых клеток было предложено задействовать комбинацию нескольких методов: иммунофенотипирования и FISH. Новый способ получил название Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation Of Neoplasms (FICTION). В данном методе используются неокрашенные мазки крови, костного мозга или препараты других тканей.

Сначала препараты инкубируют со специфическими моноклональными антителами, затем проводят конъюгацию с флуорофорами для последующего изображения комплекса антиген-моноклональное антитело.

Далее проводят гибридизацию *in situ* с ДНК-зондами. Флуорофоры, различающиеся по цвету, используются для выявления моноклональных антител и ДНК-зондов. Препарат исследуют под флуоресцентным микроскопом при наличии необходимого набора фильтров, что позволяет проводить анализ и иммунофенотипа, и гибридизационных сигналов в интерфазных ядрах.

Введение инновационной цифровой записи микроизображений позволило переводить в псевдоцвета флуорофоров и соотношения их интенсивностей, что оказалось эффективным для создания метода многоцветного бэндинга хромосом MultiColor Banding (МСВ), предназначенного не для комплексного анализа хромосом, а для детального анализа каждой хромосомы. Локус-специфичные ДНК-зонды метят различными флуорофорами (или их комбинацией) таким образом, что варьируется по интенсивности уровень сигнала каждого ДНК-зонда. Перекрывание профилей интенсивности сигналов ДНК-зондов обеспечивает вариации соотношений интенсивностей флуоресценций различных флуорофоров вдоль хромосомы. При переводе отношений интенсивностей в псевдоцвета каждой точке изображения, т.е. каждому из хромосомных локусов, будет соответствовать свой псевдоцвет.

Такая вариация многоцветного FISH-метода высокоэффективна при анализе межхромосомных и внутривхромосомных перестроек, происходящих при онкологических заболеваниях, но для ее применения необходимо заранее определить исследуемую хромосому.

Получается, что такой подход молекулярной цитогенетики применим для анализа нарушений кариотипа, которые ассоциированы с конкретными хромосомами. МСВ позволяет осуществлять анализ реорганизации хромосом в интерфазных и метафазных ядрах, благодаря сохранению пространственной организации хромосомы на всех стадиях клеточного цикла. Метафазная цитогенетика, исторически возникшая раньше интерфазной, позволяет определять широкий спектр хромосомных нарушений, но для этого необходимо, чтобы исследуемые клетки находились на стадии метафазы митоза.

Разновидность FISH-метода

Принцип сравнительной геномной гибридизации Comparative Genome Hybridization (CGH), основан на проведении реакции гибридизации *in situ* с использованием в качестве ДНК-зонда всего генома, создан для определения количественных нарушений в геноме.

Сначала анализируемую и нормальную донорскую ДНК метят флуорофорами разного цвета, превращая их ДНК-зонды. Равные количества этих зондов смешивают и используют при гибридизации с контрольным цитогенетическим препаратом.

После проведения FISH метафазы исследуют на флуоресцентном микроскопе и с помощью специализированной программы анализа изображений определяют интенсивность флуоресценции двух флуорофоров по всей длине каждой хромосомы. Если количественные изменения в кариотипе анализируемого образца отсутствуют, то будет наблюдаться конкретное соотношение интенсивности свечения двух флуорофоров, в случае же амплификации генов интенсивность сигнала соответствующего флуорофора будет расти, а в случае потери части генетического материала - падать.

Таким образом, CGH позволяет выявить геномный дисбаланс, но данный способ не подходит для регистрации сбалансированных транслокаций и инверсий. Более того, трисомии и делеции получится определить только в случае заполнения несбалансированным участком размера в не менее 10 млн. нуклеотидных пар.

Для определения происхождения различных маркерных хромосом, часто наблюдаемых в случаях онкогематологических заболеваниях, обширно применяется многоцветное кариотипирование. Данный метод проводится при задействовании ДНК-зондов сплошного окрашивания к плечам или целым хромосомам типа Whole Chromosome Paint (WCP). Эти зонды гибридизуются с множеством коротких последовательностей ДНК, которые расположены по всей длине хромосомы. Благодаря этому, хромосома выглядит равномерно окрашенной в конкретный цвет при изучении под флуоресцентным микроскопом.

Такой подход к окрашиванию хромосом повлиял на появление нового способа исследования кариотипа, а именно многоцветного кариотипирования. Для такого анализа используют ДНК-зонды, которые состоят из смеси зондов сплошного окрашивания для полного набора хромосом человека и помеченных при использовании комбинации нескольких флуорофоров. Соотношение данных флуорофоров подбирается специально для каждой пары хромосом. Используя специальные методы регистрации и компьютерные программы анализа изображений, оценивающих интенсивность свечения флуорофоров для каждой точки изображения, появляется возможность проведения кариотипирования такого, что каждая пара хромосом имеет уникальный псевдоцвет. При одновременном использовании N числа флуорофоров возможно провести анализ $2N-1$ ДНК-зондов.

Совместное использование прямо-меченых и гаптен-меченых ДНК-зондов дает возможность сократить число необходимых для визуализации в метафазе материала всех хромосом человека флуорофоров до трех, но такой вариант многоцветного FISH-метода является гораздо более трудоемким.

Различные варианты многоцветного FISH-метода призваны решать различные задачи в цитогенетической диагностике. В наше время применяются два основных метода получения псевдо многоцветных изображений. В самом простом варианте используются наборы специфических сочетаний возбуждающих и запирающих фильтров и устройство для черно-белой цифровой регистрации сигнала. Но не будем забывать, что современная техника способна совершать регистрацию не только интенсивности сигнала, но и его спектральных характеристик. Такое приборное оснащение лежит в основе спектрального кариотипирования Spectral Karyotyping (SKY).

Multitarget, Multifluor, Multicolor или Multiplex FISH (M-FISH) является общим названием традиционных многоцветных FISH-методов с использованием комплектов флуорофор-специфичных фильтров. Метод M-FISH подразумевает отдельную цифровую регистрацию сигнала всех используемых флуорофоров при последовательной замене комплектов фильтров. Специальное программное обеспечение проводит обработку записанной информации, связанной с разделением сигнала и фона и с количественной оценкой сигнала, переводя информацию об уровне сигналов флуорофоров в каждой точке изображения в псевдоцвета. Число доступных флуорофоров с неперекрывающимися спектрами возбуждения и эмиссии и наличие соответствующих комплектов фильтров являются одними из причин ограничения количества ДНК-зондов.

Обширнее всего распространен вариант M-FISH под названием 24-цветный FISH, который предназначен для одновременной идентификации материала всех хромосом человека. Этот способ высоко эффективен при детекции хромосомных транслокаций, потому что каждая пара хромосом окрашена в свой псевдоцвет, но не позволяет выявлять делеции и инверсии. Одновременное окрашивание хромосом флуоресцентным красителем DAPI может частично решить эту проблему, потому что дает возможность проведения анализа дифференциальной исчерченности хромосом. Однако качество DAPI-бэндинга хромосом после M-FISH значительно уступает даже DAPI-бэндингу после обычной *in situ* гибридизации.

Метод многоцветного бэндинга хромосом RxFISH основан на межвидовой *in situ* гибридизации и позволяет выявлять часть внутрихромосомных перестроек, при этом осуществляя анализ всего генома человека за один эксперимент. Используемые в RxFISH ДНК-зонды помечены комбинацией 3-х флуорофоров, что обеспечивает 7 псевдоцветов. Они специфично окрашивают отдельные районы хромосом и создают их цветную исчерченность.

Такая особенность ДНК-зондов для RxFISH объясняется способом их получения, ведь они являются хромосом-специфическими ДНК-библиотеками двух видов гиббонов: *Nylobates concolor* и *Nylobates syndactylus*. В результате интенсивных хромосомных перестроек при формировании современных видов гиббонов, материал их хромосом оказался сильно перемешанным по сравнению с организацией хромосом у человека. При гибридизации соединенные с различными флуорофорами участки ДНК разных хромосом гиббонов взаимодействуют с комплементарными участками ДНК на одной и той же хромосоме человека, создавая ее цветную исчерченность при изучении с использованием флуоресцентной микроскопии.

Однако область использования RxFISH имеет достаточно серьезные ограничения. Перестройки хромосом, находящихся внутри одного цветного Rх-бэнда, не могут быть получены с помощью этого способа, если они не приводят к значительным и легко видимым изменениям его размера. К тому же, зонды окрашивают несколько хромосомных районов разных хромосом в один псевдоцвет. К недостаткам RxFISH можно также отнести значительный размер многих цветных бэндов, из-за чего каждая из человеческих хромосом 15, 18, 19, 21, 22, X и Y представляет собой один цветной бэнд.

Использование в дальнейшем большего числа флуорофоров и новых ДНК-зондов может существенно увеличить разрешающие способности метода. Однако следует заметить, что при увеличении числа используемых флуорофоров RxFISH будет более информативным, чем 24-цветный FISH. Основные принципы анализа микроскопических изображений при спектральном кариотипировании (SKY) практически не отличаются от используемых при M-FISH. Отличия вызваны способом регистрации изображения, который требует детального описания спектральных характеристик объекта.

В процессе одного измерения получают спектральные кривые для всех точек изображения. Для спектрального кариотипирования всех хромосом человека используют пять флуорофоров: один в зеленом спектре, два в красном и два в инфракрасном. Возбуждение и эмиссия всех используемых при мечении ДНК-зондов флуорофоров проходит при одном комплекте фильтров, что дает возможность избежать их последовательной смены, промежуточных фокусировок и связанных с ними проблем. В одном акте экспозиции одновременно для каждой точки изображения записывается полная спектральная характеристика испускаемого света.

На основе исследования спектральных кривых выводится наличие или отсутствие в данной точке конкретных флуорофоров. На следующем этапе проводится процедура классификации, которая выполняется при помощи специального программного обеспечения, позволяющего определять хромосомную принадлежность анализируемого материала.

Большим достоинством SKY является параллельная спектральной картине регистрация и окраска DAPI. Параллельный анализ спектрального изображения и качественной дифференциальной окраски хромосом существенно упрощает интерпретацию результатов SKY и позволяет более точно определять точки хромосомных разрывов.

Классические методы цитогенетического анализа позволяют выявлять лишь около 15% идентифицируемых с помощью SKY хромосомных перестроек. Этот метод является высоко эффективным также для исследования результатов FISH в интерфазных ядрах (спектральный FISH).

К достоинствам SKY можно причислить возможность использования флуорофоров с перекрывающимися спектрами возбуждения и эмиссии, что расширяет список подходящих к использованию флуоресцентных меток и увеличивает число одновременно используемых флуорофоров. Более того, включение в список нового флуорофора не требует приобретения нового комплекта фильтров, потому что для проведения SKY

достаточно одного блока фильтров для спектрального FISH и одного блока фильтров для DAPI.

К недостаткам SKY можно причислить длительное время экспонирования, необходимое для записи микроскопических изображений. Также можно предположить, что при проведении исследований с относительно небольшими по размеру ДНК-зондами SKY является несколько менее эффективным, чем M-FISH-метод.

Заключение

В ходе данного исследования было проведено изучение флуоресцентной гибридизации и принципа и области применения FISH-метода и сравнение различных разновидностей FISH-метода.

Был выявлен перечень наиболее эффективных разновидностей, к которым можно отнести M-FISH, SKY и RxFISH. На данный момент обширнее всего применяется M-FISH, однако при большем использовании флуорофоров RxFISH покажет большую информативность. Также было показано, что SKY-метод дает возможность использовать большее количество флуоресцентных меток, но требует больше времени и при меньших размерах ДНК-зондов показывает меньшую эффективность, чем M-FISH-метод.

Список литературы

Nugis VYu. FISH-method: technique of cytogenetic retrospective dose evaluation (review). Saratov Journal of Medical Scientific Research 2016; 12 (4): 671–678.

Рубцов Н.Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих: Учеб. пособие / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2006. 152 с.

Рубцов Н.Б. Гибридизация нуклеиновых кислот in situ в анализе хромосомных аномалий. Глава в книге «Введение в молекулярную диагностику» Т. 2. «Молекулярно-генетические методы в диагностике наследственных и онкологических заболеваний» / Под ред. М.А. Пальцева, Д.В. Залетаева. Учебная литература для студентов медицинских вузов. М.: Медицина, 2011. Т. 2. С. 100–136.