روش FISH در آزمایشگاه ژنتیک

تکنیک هیبریداسیون در محل توسط Gall and Pardue و همچنین Jone و همکاران در سال ۱۹۶۹ ابداع گردید. این روش مکان یابی ژن ها یا توالی های RNA یا DNA را به مستقیم روی کروموزوم ها امکان پذیر ساخته است. در تکنیک FISH اسید های نوکلئیک تک رشته ای (معمولا DNA و گاهی اوقاتRNA) با یکدیگر برهمکنش داده می شوند به طوری که کمپلکس ها یا هیبرید هایی را با ایجاد مولکول هایی با تشابه زیاد یا توالی های مکمل را تشکیل دهند. پس از هیبریداسیون اسید های نوکلئیک، میزان همسانی توالی ها تعیین می شود. در نتیجه، توالی های خاص شناسایی شده و روی کروموزوم های خاص مکان یابی می شوند

به طور خلاصه، این تکنیک جزو اولین تکنیک های هیستوشیمیایی است که شامل استفاده از دسته های مختلفی از رنگ های طبیعی و مصنوعی برای رنگ آمیزی ساختار های سلولی و اجتماعات درون سلولی می باشد. این ترکیبات عموما غیر اختصاصی بوده و برای دسته بندی مو لکول های خاص مانند پروتین ها، اسید های نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات ها به کار می روند. اولین هیبریداسیون در محل در اواخر دهه ۱۹۶۰ انجام گردید که در آن از مواد فلورسنتی خبری نبود و به جای آن از کاوشگر های نشان دار شده با رادیو ایزوتوپ ها استفاده شد. روش FISH برای تشخیص اسیدهای نوکلئیک نیز به کار می رود و جایگزینی برای روش های قدیمی است که از کاوشگرهای رادیو اکتیو استفاده می کردند. این روش، مستلزم هیبریداسیون کاوشگر اسید نوکلئیک با اسید نوکلئیک مورد نظر در محل (in situ) است.

مراحل اصلی تکنیکFISH

در تکنیک FISH ، توالی های DNA که مکان یابی شده اند ابتدا به منظور ایجاد کاوشگرها با مواد فلورسنت نشاندار می شوند. سپس کاوشگر با کروموزوم های تعیین شده در بافر هیبریداسیون ترکیب می شوند. پس از این تیمار و دناتوره شدن DNA به رشته های مجزا، کاوشگر و محل تعیین شده برای اتصال مجدد (Re-annealing) ، آماده می شوند. کاوشگر به طور اختصاصی با مکان مکمل خود بر روی کروموزوم، باند می شود. پس از شستشو و شناسایی با گزارشگر فلورسنت، سیگنال فلورسنت در محل هیبرید کاوشگر به طور جداگانه قابل مشاهده و تشخیص با میکروسکوپ اپی فلورسنت است. به عبارت دیگر می توان گفت که هیبریداسیون در محل یک روش بسیار حساس برای تشخیص فعالیت ژن ها به طور مستقیم در سلول یا بافت

های تثبیت شده است. سلول، بافت یا جنین با فرمامید تثبیت می شود. عامل تثبیت کننده از شکستن مولکول ها جلوگیری می کند و آنها را در محل مورد نظر برای آنالیز نگه می دارد .

مراحل این تکنیک شامل:

۱ -ثابت کردن نمونه ها در روی اسلایدها،

۲ -هیبرید کردن با اولیگونوکلئوتید هایی که با مواد فلورسنت آغشته شده اند،

۳ -رنگ آمیزی با رنگ های غیر اختصاصی مانندDAPI

4- اضافه کردن مواد شستشو دهنده،

۵ -مشاهده زیر میکروسکوپ اپی فلورسنت، می باشد.

کاوشگر های اسید نوکلئیک که به طور مستقیم با رنگ های فلورسنتی نشاندار شده اند، برای شناسایی توالی های هدف بزرگ
مورد استفاده قرار می گیرند. در این روش، زمان کمتری مورد نیاز است اما شدت سیگنال های تولید شده پایین تر می باشد.
با به کار بردن لایه هایی از معرف های شمیایی شناساگر می توان شدت سیگنال ها و همچنین حساسیت را افزایش داد. با استفاده از چنین ابزار هایی، شناسایی توالی های تک نسخه ای روی کروموزوم ها با کاوشگر های کوتاه تر از ۰/۸ کیلو بازامکان پذیر می گردد. به لحاظ اندازه نیز کاوشگرها می توانند طولی در حدود چندین جفت باز (اولیگونوکلئوتید ها) تا بیشتر از یک مگا باز داشته باشند. انواع مختلف کاوشگر ها می توانند برای شناسایی انواع مشخصی از DNA به کار روند. توالی های DNA تکراری ناشی از تکثیر باPCR ، اولیگونوکلئوتید های اختصاصی برای عناصر تکراری یا عناصر تکراری کلون شده برای شناسایی دسته هایی از توالی های DNA تکراری در نواحی هتروکروماتینی یا نواحی سنترومری کروموزوم های مجزا مورد استفاده قرار می گیرند. بالعکس، برای شناسایی توالی های هدف تک لوکوسی ، cDNAها یا قطعاتی از DNA ژنومی کلون شده با اندازه ای در حدود ۱۰۰ کیلو باز تا ۱ مگا باز می توانند به کار روند. برای شناسایی کروموزوم های خاص یا نواحی کروموزومی ، cDNAهای خاص هر کروموزوم به عنوان کاوشگر به منظور تشخیص کروموزوم های مجزا از مجموعه کامل کروموزومی، مورد استفاده قرار می گیرند. برای انجام هیبریداسیون موفق عوامل زیر دخیل هستند:

۱ -طول کاوشگر

کوتاه: احتمال هیبرید شدن با مکان هایی غیر مورد نظر(Non – target)

بلند: افزایش زمان مورد نیاز برای هیبریداسیون.

۲ -درجه حرارت

برای دناتوره شدن c : ۹۴

برای هیبریداسیون: بستگی به درجه حرارت ذوب Temperature melting و شدت آن دارد.

Tبسیار پایین: هیبریدهای ناهماهنگ رخ می دهد

Tبسیار بالا : هیبریداسیون رخ نمی دهد

۳ -غلظت نمک و pH و فرمامید

مزایای و تغییرات تکنیکFISH

روش های اولیه تشخیص ایزوتوپ از طریق استراتژی های نشاندار کردن غیر اختصاصی مانند ادغام تصادفی بازهای تغییر یافته رادیواکتیو به سلول های در حال رشد انجام می گرفتند و توسط روش های اتورادیوگرافی دنبال می شدند. مشکلات متعدد هیبریداسیون ایزوتوپیک الهام بخش گسترش تکنیک های جدید مانند FISH بوده است:

۱ -مواد رادیو اکتیو طبیعی مورد نیاز برای کاوشگرها ، ناپایدار است . ایزوتوپ ها با مرور زمان از بین می روند و بنابراین
فعالیت اختصاصی این کاوشگرها به طور ثابت باقی نمی ماند،
۲ -هر چند که حساسیت روش اتورادیوگرافی بالاست اما وضوح آن پایین است،
۳ -برای تولید سیگنال های قابل اندازه گیری روی فیلم رادیوگرافی، زمان های تماس زیادی مورد نیاز است،
۴ -کاوشگرهای رادیواکتیو گران هستند و در ضمن مواد رادیواکتیو به کار رفته در آنها خطرناک می باشند.

بنابراین ، FISH پیشرفت های چشمگیری را در وضوح، سرعت و امنیت امکان پذیر ساخته است و راه را برای

توسعه شناسایی همزمان مولکول های هدف چند تایی، آنالیز های کمی و تصویر برداری های زنده سلولی هموار ساخته است. اهداف جدید منجر به کاربرد های جدید در روند تکامل این تکنیک شده و محبوبیت این آزمایش به طور چشمگیری در دهه ۱۹۹۰ افزایش یافت.

یکی از تغییرات مهم در تکنیک هیبریداسیون در محل، تکنیک GISH است که توسط Schwarzacher و همکاران در سال ۱۹۹۲ برای گیاهان ابداع شد. این تکنیک ابزار قدرتمندی برای متمایز کردن کروموزوم های ژنوم های والدی مختلف در گونه های پلوئید، هیبریدهای بین گونه ای و نتایج حاصل از بک کراس آنها و همچنین ردیابی بین ژنومی جابه جایی کروموزوم ها می باشد و اطلاعاتی راجع به منشاء، ترکیب ژنومی و جابه جایی های بین ژنومی به ما می دهد. کاربرد این تکنیک در گیاهان هیبرید، تعیین منشاء ژنوم کروموزوم های جفت شده و جفت نشده را در آرایش کروموزوم ها در متافاز I امکان پذیر ساخته است. در تکنیک GISHکه تکنیک رنگ آمیزی ژنومی است و تشخیص ژنوم های مادری در هیبریدهای بین گونه ای را فراهم می کند، کل DNA ژنومی از یک والد نشان دار می شود به عنوان کاوشگر و کل DNA ژنومی والد دیگر به صورت غیر نشان دار باقی می ماند و به عنوان یک block (قالب) به کار می رود؛ یا این که کل DNA هر دو والد نشان دار شده و به عنوان کاوشگر مورد استفاده قرار می گیرند . سپس هر کدام با رنگ های فلورسنتی مختلف شناسایی می شوند. این تکنیک براساس تکامل سریع در گونه زایی توالی های تکراری است که بخش اعظمی از DNAگیاه را مشخص می کند. اگر گونه ها به اندازه کافی از هم فاصله داشته باشند (به لحاظ تکاملی)، توالی های تکراری باعث می شوند که کروموزوم های ناشی از دو گونه والدی، تمایز یابند.

کاربردهایFISH

تکنیک FISH کاربرد های فراوانی در بیولوژی مولکولی و مطالعات ساختار و نحوه عمل سلولی دارد. در مطالعات کلینیکی، FISH می تواند برای تشخیص پیش از تولد ناهنجاری های کروموزومی ارثی، تشخیص پس از تولد افراد ناقل بیماری های ژنتیکی، تشخیص بیماری های عفونی، بیماری های باکتریایی و ویروسی، تشخیص سیتوزنتیکی تومور ها و شناسایی اختلالات ناشی از بیان ژن ها مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعات ازمایشگاهی ، FISHبرای تهیه نقشه ژن های کروموزومی، مطالعه تکامل ژنوم ها، آنالیز سازمان هسته، تصویر برداری از نواحی کروموزومی و کروماتین در سلول های اینتر فازی، آنالیز فرایند های پویای هسته ای و سلول های هیبریدی سوماتیکی، همانند سازی، دسته بندی کروموزوم ها و مطالعه بیولوزی تومور ها به کار می رود. این تکنیک برای مطالعه بیان موقت ژن ها در طی تمایز و توسعه سلول نیز مورد استفاده قرار می گیرد. اخیرا، تکنیک FISH با وضوح بالا به روشی رایج برای دسته بندی ژن ها یا مارکر های DNA در نواحی کروموزومی مورد نظرتبدیل شده است.

آنالیز های کروموزومی توسط تکنیک FISH منجر به پیشرفت های چشمگیر در تحقیقات سیتوژنتیک شده است. مثال بارز از توانایی روش های هیبریداسیونی در تحقیقات ژنومی، هیبریداسیون ژنومی مقایسه ای است که در طی آن حذف شدگی ها و مضاعف شدن های نواحی کروموزومی توسط سیگنال های مختلف فلورسنتی شناسایی می شوند.

به طور خلاصه می توان کاربرد های زیر را برای تکنیک FISH برشمرد:

۱ -اولین کاربرد این تکنیک در سال ۱۹۸۰ انجام شد. در آن زمان RNA مستقیماً از انتهای ۳ با مواد فلورسنت نشان دار شد و به عنوان کاوشگر برای توالی های خاص مورد استفاده قرار گرفت.

۲ -مقایسه نواحی خاص در بسیاری از گونه ها و مکان یابی ژن های خاص روی کروموزوم

۳ -آنالیز ساختمانی ژنوم

۴ – شناسایی غلظت های بالای جفت بازها (یعنی مکان هایی که به لحاظ باندهای A-T یا C-G غنی باشند)

۵ -کمک به تهیه نقشه های ژنی ، فیزیکی و ستیوژنتیکی و تشخیص فعالیت ژن ها

۶ -تعیین سطح پلوئیدی

۷ – تشخیص مکان یک ناحیه از RNAیاDNA

منابع

Bauman JG, Wiegant J, Borst P, and van Duijn, P. 1980. A new method for fluorescencemicroscopical

localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. Exp. Cell Res.
128: 485-490.
Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi, OP. 1997. Genome screening by comparative
genomic hybridization. Trends Genet. 13: 405-409.
Gall, J. and Pardue, M. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid

molecules in cytological
preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. 63: 378-383.
Jeffrey, M.L. and Singer, R.H. 2003. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. J. Cell Science.
116: 2833-2838.
John H, Birnstiel M, Jones K. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature. 223: 582-587.
Nath J. 2000. A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects. Biotech
Histochem. 75: 54-78.
Raina, S.N. and Rani, V. 2001. GISH technology in plant genome research. Methods Cell Sci. 23: 83–۱۰۴ر
Schwarzacher T, Anamthawat-Jónsson K, Harrison GE, Islam AKM, Jia, JZ, King IP, Leitch AR, Miller TE,
Reader, SM, Rogers, WJ, Shi M, Heslop-Harrison JS. 1992. Genomic in situ hybridization to identify alien
chromosomes and chromosome segments in wheat. Theor. Appl. Genet. 84: 778-786.
Trask, BJ. 2002. Human genetics and disease: human cytogenetics, 46 chromosomes, 46 years and counting.
Nat. Rev. Genet. 3: 769-778.