معرفی کامل اصول و کاربردهای تکنیک FISH

Fluorescent in situ hybridization

در تکینک FISH، مولکول‌های پروب مستقیما با مولکول‌های DNA و RNA داخل سلولی هیبرید می‌شوند و موقعیت اتصال قطعه DNA به کروموزوم را می‌توان به سادگی توسط میکروسکوپ تعیین کرد. در واقع این تکنیک، حاصل ترکیب سیتوژنتیک با تکنولوژی‌های ژنتیک مولکولی است و از اواسط دهه ۱۹۹۰، به صورت گسترده‌ای به منظور تشخیص کلینیکی به کار می‌رود.

اساس تکنیک FISH، توانایی قطعه‌ای از مولکول تک‌رشته‌ای DNA در اتصال به توالی مکمل خود روی کروموزوم متافازی، هسته اینترفازی و یا extended chromatin fiber است. پس نیاز به فرایندهای پردازشی ویژه‌ای خواهد بود. این مولکول، پروب نام دارد و بخش کوچکی از DNA می‌باشد که با تگ‌های فلورسنت لیبل شده است. فلوروکروم‌ها امکان تشخیص ناحیه هیبریداسیون را با استفاده از میکروسکوپ‌های فلورسنت فراهم می‌کنند.

سلول‌های هدف می توانند از قطعات بسیار کوچک بافتی از ارگانیسمی مشخص تهیه شوند. همانند زمانی که بیوپسی تهیه می شود، بافت موردنظر فیکس و سپس به قطعات بسیار کوچک تقسیم می‌گردد تا بتوان آن را زیر میکروسکوپ آنالیز نمود. منبع دیگری که برای تهیه سلول‌ها استفاده می‌شود، سلول‌های کشت‌شده هستند. به علاوه می‌توان از خون استفاده و طی پردازش‌های ویژه‌ای گلبول‌های سفید و سپس کروموزوم‌های موجود در آن‌ها را استخراج نمود.

در تکنیک FISH کروموزومی عادی، کروموزوم‌های مورد استفاده در مرحله متافاز یا پرومتافاز و به صورت پراکنده و فیکس وی اسلاید شیشه‌ای هستند و با پروب‌های DNA هوموژن هیبرید خواهند شد. هیبریداسیون پروب، غالبا به صورت دو نقطه در DNA مورد بررسی مشاهده می‌شود؛ چون پروب لیبل‌شده به هر دو کروماتید خواهری متصل خواهد شد. حداکثر رزلوشن FISH متافازی در حد چندین مگاباز است که با استفاده از fiber FISH می‌توان آن را در حد کیلوباز افزایش داد.

تکنیک FISH اینترفازی نیز به علت فشردگی کمتر کروموزوم‌ها در این مرحله، رزلوشن بالایی دارد. در این حالت، مولکول‌های پروب با DNA های کروموزومی هدف که داخل سلول‌ها و یا هسته‌های آماده‌سازی شده

هستند، هیبرید می‌شوند. این هسته‌ها یا سلول‌ها باید تحت تاثیر آنزیم ها هضم شوند تا پروب بتواند به آن‌ها دسترسی پیدا کند. تکنیک FISH اینترفازی می‌تواند روی نمونه‌های تازه و فریزشده و یا روی موادی که در پارافین فیکس شده اند، انجام بگیرد.

پروب‌های مورداستفاده در FISH انواع مختلفی دارند:

پروب‌های سنترومریک مخصوص توالی‌های DNA تکراری هستند که در اطراف سنترومر کروموزوم موردنظر و یا در داخل آن قرار گرفته‌اند. در واقع این پروب‌ها بودند که در ابتدا به منظور تشخیص سندروم‌های آنوپلوئیدی شایع (تریزومی‌های ۱۳ و ۱۸ و ۲۱) از نمونه پرزهای کوریونی استفاده می شدند.

پروب‌هایChromosome-Specific Unique-Sequence Probe اختصاصی یک لوکوس ژنی مشخص می‌باشند و کاربرد آن‌ها در تشخیص جهش‌های حذف یا مضاعف شدن submicroscopic است.

پروب‌های Whole-Chromosome Paint شامل دسته‌ای از پروب‌ها هستند که از نواحی مختلفی از یک کروموزوم مشخص تهیه شده اند. در صورت استفاده از ترکیب این پروب‌ها در یک فرایند هیبریداسیون، کل کروموزوم فلورسنس نشر خواهد کرد. کاربرد این پروب‌ها در تشخیص rearrangement های پیچیده مانند جابه‌جایی‌های جزئی و نیز تشخیص SMC ها است.

لیبل کردن پروب‌ها می‌تواند به صورت مستقیم با الحاق پیش‌سازهای نوکلئوتیدی لیبل‌شده با مواد فلورسنت به ساختار پروب صورت بگیرد. همچنین نوکلئوتیدهای حاوی مولکول‌های reporter مانند بیوتین و دیگوکسی‌ژنین وارد ساختار DNA می‌گردند که خواهند توانست به صورت اختصاصی به مولکول‌های affinity که با مواد فلورسنت لیبل شده اند، متصل شوند. با استفاده از تجهیزات پیشرفته پردازش تصویر و مولکول‌های متصل‌شونده به reporter که دارای رنگ‌های فلورسنت متفاوتی هستند، می‌توان چندین پروب DNA را به صورت همزمان با DNA هدف هیبرید کرد، به نحوی که موقعیت چندین توالی خاص در ارتباط با یکدیگر شناسایی شود.

مولکول‌های DNA صرف نظر از منبع مورد استفاده، باید حرارت داده شوند تا تبدیل به مولکول‌های تک‌رشته‌ای گردند. در صورتی که مولکول‌های هدف از جنس RNA باشند نیازی به حرارت دادن نخواهد بود.در مرحله بعدی محلول حاوی پروب‌ها لیبل‌شده به نمونه فیکس‌شده، افزوده و نتایج زیر میکروسکوپ بررسی می‌شوند. لیبل‌های مورد استفاده در پروب‌ها، مانند مواد فلوئوروسنت، باعث می‌شوند که در صورت وجود توالی هدف و

انجام شدن هیبریداسیون با توالی‌های مکمل، تغییرات قابل مشاهده‌ای در نمونه از جمله نشر نور با طول موج معین، ایجاد شود. در نتیجه موقعیت پروب روی کروموزوم قابل مشاهده می‌گردد.