

Hybridizace in situ

Hybridizace in situ patří mezi molekulárně cytogenetická vyšetření. Jedná se o metodu, která umožňuje lokalizaci a identifikaci specifické sekvence nukleotidů v DNA, popř. RNA. Metoda využívá procesu denaturace a reasociace DNA. Pojem hybridizace znamená, že se podle pravidel komplementarity spojí vlákno vyšetřované DNA s druhým vláknem, kterým je sonda, která bývá označená. K hybridizaci dochází přímo ve vyšetřovaném biologickém materiálu, tedy na místě (*in situ*), nikoli na izolované DNA. Jako vyšetřovaný vzorek mohou být využity chromozomy z buněk v metafázi, interfázni jádra nebo celé buňky například z histologických řezů. Nejčastěji využívanou metodou hybridizace in situ je metoda FISH, při které se používají fluorescenčně značené sondy.

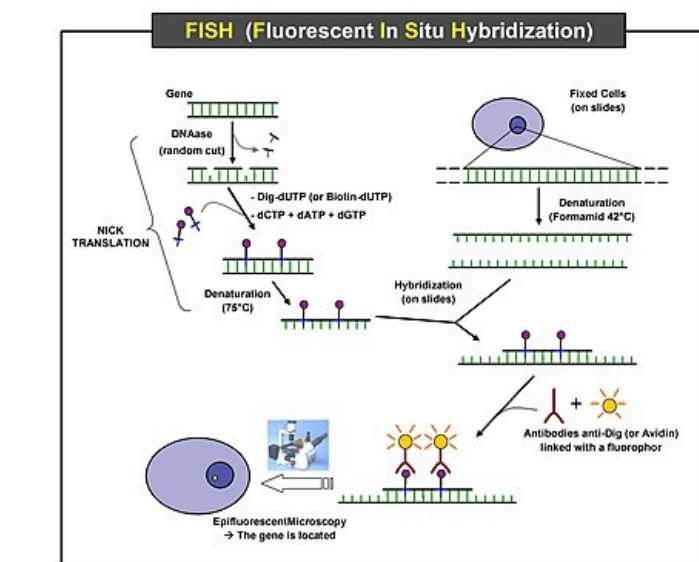
Princip

Vyšetřovaná nukleová kyselina nejprve musí být denaturována. Dojde k rozrušení vodíkových můstků mezi bázemi a oddělení řetězců. Tímto způsobem získáme z původní dvoušroubovice DNA dva jednoduché polynukleotidové řetězce. Po navození reasociačních podmínek je na ně poté podle pravidel komplementarity bází navázán krátký a značený úsek nukleové kyseliny, tzv. sonda. Navázání sondy na vyšetřovanou DNA se projeví jako hybridizační signál, který můžeme pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu.

Denaturace

Denuraci neboli oddělení polynukleotidových řetězců lze vyvolat působením zvýšené teploty (94–96 °C), některými chemickými sloučeninami nebo specifickými enzymy. Teplota, při které je v roztoku denaturováno 50 % DNA, se nazývá **teplota bodu tání (T_m)** a závisí na mnoha faktorech:

- **na podílu párů G-C,**
 - čím vyšší, tím vyšší je T_m,
- **na koncentraci solí v roztoku** (resp. na iontové síle),
 - čím vyšší je koncentrace solí (resp. monovalentních kationtů – například Na⁺), tím je hodnota T_m vyšší,
 - využívá se toho při odmývání nespecifických signálů (sníží se koncentrace monovalentních kationtů),
- **na hodnotě pH roztoku,**
 - výrazně vyšší nebo výrazně nižší pH než 5–6 způsobí destabilizaci DNA,
- **na přítomnosti denaturačních činidel v roztoku,**
 - např. formamidu, močoviny, hydroxidů apod.



FISH

Postup

1. Příprava materiálu (kultivace, izolace jader, resp. chromozomů atd.)
2. Denaturace sondy a cílové DNA – vysokou teplotou (společně nebo odděleně)
3. Hybridizace sondy a cílové DNA – ochlazením (37 °C)
4. Odstranění nespecifických signálů (stringent washing)
(Provádí se působením formamidu nebo roztoku o nízké iontové síle za současného zvýšení teploty a sonda se tak odstraní z míst, k nimž není zcela komplementární.)
5. Counterstaining (fluorescenční obarvení všech chromozomů, resp. jader)
6. Vyhodnocení pod fluorescenčním mikroskopem s využitím specializovaného počítačového programu

Sondy

Sonda (próba) je uměle připravený, obvykle oligo- nebo polynukleotidový řetězec, který se naváže na cílovou DNA. Může jít o úsek DNA klonované pomocí vektorů nebo amplifikované pomocí PCR. Aby bylo možné pozorovat hybridizační signál, musí být sonda značená.

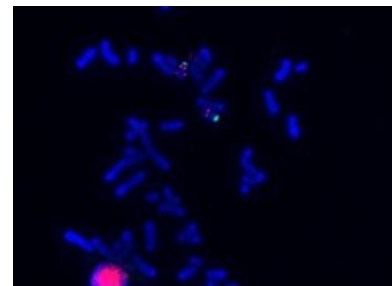
Značení sond

- **Přímé značení:**
 - Umožňuje pozorovat hybridizační signál ihned po skončení hybridizace. Nevýhodou je, že signál nelze zesílit.
 - K přímému značení se nejčastěji využívá:

- fluorescenční barvivo – fluorochrom (metoda FISH)
- radioaktivní izotop
- **Nepřímé značení:**
 - Sonda je značena haptenem (látkou s antigenními vlastnostmi), který je následně detekován pomocí značené protilátky.
 - Hybridizační signál je možné zesílit (amplifikovat).
 - Je také možné protilátku konjugovat s enzymem, který katalyzuje vznik barevné reakce.
 - Příkladem haptenu je biotin, který se detekuje pomocí avidinu konjugovaného s fluorochromem nebo enzymem.

Typy sond

- **Satelitní sondy** (telomerické nebo centromerické)
 - Hybridizují s oblastmi obsahujícími satelitní sekvenční.
 - *použití:* vyšetření aneuploidií, identifikace původu marker chromosomů
- **Lokus specifické sondy**
 - Hybridizují s jedinečnými sekvencemi DNA (jednotlivými geny, popř. skupinami genů).
 - *použití:* vyšetření mikrolecí u mikrolečnických syndromů a malignit a některých specifických translokací
- **Malovací sondy** (celochromozomové, parciální)
 - Hybridizují s mnohočetnými chromosomovými sekvencemi, lze jimi označit celý chromosom.
 - Nelze použít na interfázních jádrech.
 - *použití:* vyšetření chromosomových přestaveb



FISH lokus specifická sonda, M. Prader-Willi, delece 15q11-q13

Odkazy

Související články

- Identifikace chromosomů
- Molekulární cytogenetika

Použitá literatura

- KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vydání. Brno : Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- KOČÁREK, Eduard a Martin PÁNEK. *Klinická cytogenetika I : úvod do klinické cytogenetiky*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1880-7.
- MAŇÁKOVÁ, Eva a Alexandra SEICHERTOVÁ. *Metody v histologii*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0230-X.