

Metoda: Fluorescenční hybridizace in situ (FISH)

Student: Nguyen Huy Robert, 2. ročník (ZČU, FZS - ZL)

Princip: Fluorescenční hybridizace in situ je metoda, která je založena na schopnosti dvouřetězcové DNA denaturovat, renaturovat nebo-li schopnost DNA opakovaně tvořit jedno a dvou řetězcové struktury na základě komplementarity bází nukleových kyselin. Důležitá je také sekvenční specifita bází nukleových kyselin pro určitou oblast (lokus). Vysoké teploty či vysoké pH (vliv vnějších podmínek) mohou způsobit zánik vodíkových vazeb mezi nukleotidy komplementárních řetězců a lineární řetězce se mohou oddělit - tzv. denaturovat (vzniknou dva jednovláknové řetězce). Při pozvolném návratu (při snížení teploty, snížení pH) mohou komplementární vlákna renaturovat (znovu vytvořit dvoušroubovici). Výchozím krokem pro hybridizaci je příprava hybridizační sondy. Sonda, je jednořetězcová, značená (fluorescenčně) nukleotidová sekvence vázající se komplementárně k cílové sekvenci (DNA nebo RNA). Sonda najde komplementární část nukleové kyseliny a při hybridizaci se k ní. Vytvoří se hybridní dvouřetězcová DNA molekula, kde jeden řetězec tvoří genomická DNA a druhý uměle nasyntetizovaná DNA sonda. Sonda je značena fluorescenční značkou - tzv. fluorochromem, aby ji bylo možné sledovat ve tkáni.

Uplatnění metody: Fluorescenční hybridizaci in situ můžeme v patologii/histologii využít k detekci přítomnosti cizorodé DNA. Příkladem může být detekce lidského papilomaviru (HPV) v buňkách děložního čípku s využitím sondy, která je specifická pro virovou DNA HPV. Můžeme využít také k detekci translokace chromozomů (folikulární lymfom, Burkittův lymfom, chronická myeloidní leukémie). Další možnost využití FISH je analýza aneuploid (= změny v počtu celých chromozomů). Příkladem je detekce trizomie chromozomu 8 u akutní myeloidní leukémie. Metodu FISH můžeme využít k analýze amplifikace genů. Použije se sonda specifická pro sledovaný gen a určíme počet signálu v jednotlivých buňkách. Příkladem může být sledování amplifikace genu u karcinomů prsu, žaludku, pankreatu a dalších typů nádorů.

Úskalí metody: Efektivitu hybridizace ovlivňují fyzikální podmínky (teplota, koncentrace solí, pH, špatný řez) a délka hybridizovaných molekul. Další problém FISH metody je postupné slábnutí hybridizačního signálu. Laboratoře tento problém řeší zachycením signálu pomocí digitálních snímků. Různé druhy artefaktů na parafinových řezech jsou dalším limitujícím faktorem FISH metody.

Přístrojové vybavení: termostat, inkubátor, fluorescenční mikroskop

Odběr a transport: histologické preparáty z parafinových bločků, fixované na podložním sklíčku