Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

دورگه‌سازی در محل؛ اصول و کاربردها : *مقاله مروری*

زهرا نزهت
مهدی هدایتی*

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شهید چمران، ولنجک، خیابان یمن، ابتدای خیابان پروانه، پلاک ۲٤، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز ومتابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، کدپستی: ۱۹۸۵۷۱۷٤۱۳
تلفن: ۰۲۱-۲۲٤۳۲٤۹۸
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۹ آنلاین: ۱۳۹٤/۰۲/۲۰

دورگه‌سازی در محل، روشی است که در آن از پروب‌های اسید نوکلئیک برای بررسی انواع تغییرات ژنتیکی در سلول‌های دست‌نخورده و بافت‌های تثبیت‌شده استفاده می‌شود. مراحل مختلف این روش شامل انتخاب پروب، آماده‌سازی نمونه، تیمار پیش از دورگه‌سازی، دورگه‌سازی، شستشو، آشکارسازی و روند کنترل می‌باشند. انتخاب پروب مناسب یکی از جنبه‌های مهم انجام فرایند دورگه‌سازی موفقیت‌آمیز است. حساسیت و ویژگی In situ Hybridization (ISH) می‌تواند توسط عوامل مختلفی مانند ساختار پروب، روش نشاندار کردن، درصد جفت بازهای GC، طول پروب و سیستم آشکارسازی سیگنال تحت تاثیر قرار گیرد. تهیه پروب‌ها به چندین روش انجام می‌گیرد و از مواد رادیواکتیو و غیررادیواکتیو جهت نشاندار کردن آنها استفاده می‌شود. مرحله آماده‌سازی، با هدف حفظ اسیدهای نوکلئیک در نمونه، حفظ مورفولوژی سلول‌ها و بافت و افزایش نفوذ پروب به داخل نمونه انجام می‌گیرد. پس از مرحله آماده‌سازی، محلول حاوی پروب جهت انجام فرایند دورگه‌سازی به نمونه اضافه شده و پس از انکوباسیون یک شبه، پروب‌های متصل‌نشده از طریق شستشو، حذف می‌گردند. نحوه آشکارسازی سیگنال‌ها با توجه به نوع ماده مورد استفاده برای نشاندار کردن پروب‌ها متفاوت خواهد بود. استفاده از فرایندهای کنترل گوناگون برای اطمینان از ویژگی دورگه‌سازی، اهمیت بسیاری دارد. در تکنیک‌های مختلفی مانند Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)، Chromogenic in situ hybridization (CISH)، Genomic in situ hybridization (GISH)، Comparative genomic hybridization (CGH)، Spectral karyotyping (SKY) و Multiplex fluorescence in situ hybridization (MFISH)، از دورگه‌سازی در محل استفاده می‌شود. این تکنیک‌ها کاربردهای بسیار مهمی در تشخیص سرطان، بیماری‌های ژنتیکی و عفونی دارند. در این مقاله مروری فرایند دورگه‌سازی در محل، انواع مختلف آن، کاربردها، مزایا و معایب هر یک از آنها مورد بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: دورگه‌سازی در محل، پروب مولکولی، پروب‌هایی از جنس DNA، دورگه‌سازی قیاسیِ ژنوم.

مقدمه

دورگه‌سازی در محل (In Situ Hybridization, ISH) یا دورگه‌سازی هیستوشیمی (Hybridization Histochemistry)، روشی است که در آن از پروب‌های اسیدنوکلئیکی برای شناسایی DNA یا RNA در جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها استفاده می‌شود. این روش برای اولین بار در سال ۱۹٦۹ توسط Gall و Pardue به‌عنوان فرایندی جهت تعیین موقعیت دورگه‌های DNA-RNA در نمونه‌های بافتی معرفی گردید.[۱-٦] در این دوره، رادیوایزوتوپ‌ها تنها عوامل نشاندارسازی اسیدهای نوکلئیک و اتورادیوگرافی تنها روش آشکارسازی توالی‌های دورگه بودند، علاوه بر این کلونینگ مولکولی نیز امکان‌پذیر نبود و ISH به توالی‌های تخلیص شده، طی روش‌های بیوشیمیاییِ معمولی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

(مانند DNA ماهواره‌ای موش، DNA ویروسی، RNAهای ریبوزومی) محدود می‌شد.[۷و۸] بیشترین توسعه این روش در دهه ۱۹۸۰ با پیدایش فناوری DNA نوترکیب و چیره‌شدن بر مشکلات مربوط به تهیه پروب، صورت گرفت.[۲] طی چهل سال اخیر، پیشرفت‌های بسیاری در اساس ISH حاصل شده است. این روش جهت بررسی رونویسی ژن‌ها در بافت‌های مختلف به‌ویژه بافت عصبی به‌کار می‌رود. بدیهی است که تنظیم شدید رونویسی ژن‌ها برای عملکرد مغز ضروری است. طی این فرایند مورفولوژی بافت و سلول‌های هدف حفظ می‌گردد. اساس ISH، مشابه روش‌های دورگه‌سازی معمولی و مبتنی بر تشکیل پیوند هیدروژنی بین پروب‌های DNA یا RNA با توالی‌های DNA یا RNA مکملشان در درون سلول یا بافت هدف می‌باشد. پروب‌ها با طولی حدود ۳۰۰-۵۰ جفت باز و با هدف نشاندار کردن توالی‌های DNA یا RNA، به‌منظور شناسایی توالی‌های اختصاصی DNA یا RNA ساخته می‌شوند.[۱] چنین روشی، تجزیه و تحلیل توزیع مکانی mRNA را در نمونه مورد بررسی که شامل سلول‌ها و بافت‌های تثبیت‌شده است، ممکن می‌سازد.[۶] داده‌های حاصل از این روش، به‌طور قابل‌توجهی ما را در زمینه‌های مختلف پژوهشی مانند تعیین نقشه ژنتیکی انسان، بررسی عفونت‌های ویروسی، سیتوژنتیک، سنتز پروتیین، تشخیص پیش از تولد و پیوند بافت یاری می‌رسانند.[۹] در این مقاله مروری، به اصول اساسی دورگه‌ساز در محل، انواع آن، کاربردها، برتری و کاستی‌های هر یک از آنها اشاره شده است.

مراحل دورگه‌سازی در محل:

۱- انتخاب پروب: انتخاب پروب‌های مناسب از جنبه‌های بسیار مهم انجام یک دورگه‌سازی موفق‌آمیز محسوب می‌شود.[۶] دورگه‌سازیِ پروب‌ها با رشته‌های مکمل، می‌تواند برای یافتن تغییرات درون ژنوم (DNA-ISH) یا تغییرات موجود در بیان رونوشت‌های اختصاصی (RNA-ISH)، مورد استفاده قرار گیرد و مطالعات ایمونوهیستوشیمیِ بیان پروتیین‌ها را تکمیل نماید.[۱۰] هنگام انتخاب پروب، ویژگی‌های زیر باید در نظر گرفته شوند:

۱) ساختار پروب‌ها: پروب‌های الیگونوکلئوتیدی مصنوعی به‌دلیل ویژگی بالا، تک رشته بودن و طول کوتاه‌تر (۵۰-۱۰ نوکلئوتید)، نسبت به پروب‌های حاصل از کلون کردن DNA مناسب‌تر هستند، ۲) کارآمدی نشاندار کردن: بر اساس گزارش‌ها، نشاندار کردن با استفاده از آغازش تصادفی (Random priming) بسیار موثرتر از Nick translation است، گرچه هر دو روش می‌توانند برای تولید پروب‌هایی با طول مناسب به‌کار روند، ۳) درصد جفت بازهای GC: چه بیشتر باشد دمای ذوب (Tm) بالاتر خواهد بود، ٤) پروب‌های RNA در مقابل پروب‌های DNA: استحکام پیوند هیدروژنی میان پروب و مولکولِ هدف به‌ترتیب RNA-RNA، DNA-RNA و DNA-DNA کاهش می‌یابد، ۵) طول پروب: که اگر کوتاه‌تر باشد، نفوذ بهتری به داخل سلول‌ها خواهد داشت، ٦) سیستم‌های آشکارساز سیگنال: آشکارسازی نشانه‌های رادیواکتیوی به‌کمک اتورادیوگرافی بسیار حساس‌تر از سیستم‌های آشکارسازی نشانه‌های آنزیمی می‌باشد.[۲]

انواع پروب‌ها: انواع پروب‌ها که در روش ISH مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل dsDNA، ssDNA های تکثیرشده با PCR، RNA های تک‌رشته‌ای آنتی‌سنس (ریبونوکلئوتیدها)، الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی و الیگوریبونوکلئوتیدها می‌باشند.[۳]

الف- پروب‌هایی از جنس DNA: شامل پروب‌های dsDNA و ssDNA هستند. ساخت پروب‌های dsDNA به‌نسبت آسان است زیرا نیازی به سابکلونینگ ندارند و بسیاری از برچسب‌های مختلف می‌توانند به DNA متصل شوند و پروب‌هایی با فعالیت ویژه بالا تولید نمایند. از معایب پروب‌های dsDNA این است که DNA پیش از دورگه‌سازی باید واسرشت و یا دناتوره گردد. طی واکنش دورگه‌سازی، مولکول‌های DNA تک‌رشته‌ایِ حاصل از واسرشت نمودن پروب و RNA یا DNA هدفِ تک‌رشته‌ای، برای اتصال به رشته دیگر پروب، رقابت می‌کنند و این امر می‌تواند حساسیت واکنش را کاهش دهد. استفاده از ssDNA چنین مشکلی را حل می‌کند ولی در کل نیازمند فرایندهای پیچیده و پرهزینه سابکلونینگ برای تولید پروب می‌باشد.[۱] پروب‌هایی از جنس DNA به‌طور معمول برای پژوهش‌های ژنتیکی یا سرطان‌شناسی استفاده می‌شوند. این پروب‌ها به چهار گروه: پروب‌های شمارش کروموزوم (Chromosome Enumeration Probes, CEP)، نشانگرهای اختصاصی لوکوس (Locus-specific Indicator, LSI)، پروب‌های تلومری (Telomeric probes) و رنگ‌های کروموزومی (chromosome paints) طبقه‌بندی می‌شوند.[۱۱]

پروب‌های Chromosome Enumeration Probes (CEP): این پروب‌ها با توالی‌های تکراری موجود در نزدیکی سانترومر

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

کروموزوم‌ها (DNA ماهواره‌ای آلفا) هیبرید می‌شوند. توالی‌های تکراری سانترومری در کروموزوم‌های مختلف، واگرایی قابل‌توجهی را (به‌طور تقریبی ۴۰-۲۰٪) نشان می‌دهند، به‌همین دلیل پروب‌های اختصاصی برای بیشتر سانترومرهای کروموزومی در دسترس می‌باشند. پروب‌های CEP برای شمارش تعداد کپی‌های یک کروموزوم معین در داخل یک سلول استفاده می‌شوند. اگر سانترومر یک کروموزوم حذف شده باشد نشان‌دهنده حذف یک کروموزوم به‌طور کامل است و به‌همین دلیل این پروب‌ها قادر به شمارش تعداد کپی‌های کروموزوم می‌باشند. سیگنال‌های ایجاد شده توسط پروب‌های CEP، سیگنال‌هایی قوی و بسیار واضح هستند.[۱۱]

Locus Specific Probes (LSP): این پروب‌ها با توالی‌های غیرتکراری هیبرید می‌شوند و به‌طور معمول برای تعیین تکثیر ژن‌های ویژه (مانند HER2)، حذف ژن‌های خاص (مانند p53 یا p16) و جابه‌جایی ژن‌ها (مانند جابه‌جایی BCR/ABL) مورد استفاده قرار می‌گیرند. چنین پروب‌هایی به‌طور معمول با نواحی به طول ۵۰۰-۴۰ کیلوباز هیبرید می‌شوند. سیگنال‌های ناشی از پروب‌هایی با طول کمتر از ۴۰ kb، اغلب ضعیف بوده و به‌راحتی قابل مشاهده نمی‌باشند. تشخیص سیگنال‌های مربوط به پروب‌هایی با طول بیش از ۵۰۰ kb نیز به‌دلیل پراکندگی سیگنال‌ها، کار دشواری است.[۱۱]

Telomeric Probes (TP): این پروب‌ها به‌طور دقیق به توالی‌های تلومری متصل نمی‌شوند و برای توالی‌های DNA با یک رونوشت در نزدیکی تلومر طراحی شده‌اند، بنابراین پروب‌های ساب‌تلومریک نامیده می‌شوند. پروب‌های تلومری منحصر به فرد برای ۴۱ تلومر از ۴۶ تلومر کروموزومی در دسترس هستند. تنها تلومرهایی که برای آنها پروب وجود ندارد بازوی کوتاه کروموزوم‌های آکروسنتریک ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱ و ۲۲ هستند ولی چون این مناطق DNA ریبوزومی دارند، حذف یا مضاعف شدگی در آنها به‌ظاهر اهمیت بالینی ندارد.[۱۱]

پروب‌های رنگیِ کروموزومی: مخلوطی از پروب‌ها هستند که قادرند با کل طول یک یا چند کروموزوم هیبرید تشکیل دهند. مراحل تهیه این پروب‌ها به این ترتیب است که ابتدا کروموزوم‌های منفرد از طریق فلوسایتومتری جداسازی می‌شوند و سپس از طریق PCR با استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدیِ Degenerate تکثیر می‌یابند. قطعات الیگونوکلئوتیدیِ تکثیریافته، با استفاده از مواد قابل ردیابی مانند ترکیبات فلورسانسِ نشاندار شده و پروب‌های رنگیِ کروموزومی، نشاندار می‌شوند. پروب‌های حاصل از این فرایند می‌توانند برای رنگ‌آمیزی کل کروموزوم به‌صورت همگن، مورد استفاده قرار گیرند. رنگ‌های کروموزومی برای شناسایی کروموزوم‌های خاص در مرحله متافاز به‌کار می‌روند. زمانی که کاریوتایپینگ استاندارد توانایی شناسایی یک کروموزوم، مانند کروموزوم‌های مارکر را نداشته باشد، استفاده از این پروب‌ها می‌تواند سودمند باشد.[۱۱]

ب- پروب‌هایی از جنس RNA یا ریبوپروب‌ها: استفاده از ریبوپروب‌ها در ISH برای اولین‌بار توسط Angerer و همکارانش پیشنهاد گردید. ریبوپروب‌ها، مولکول‌های تک‌رشته‌ای RNA هستند که از یک cDNA کلون شده به‌دست می‌آیند. چون این پروب‌ها تک‌رشته‌ای هستند، احتمال پیوستن آنها با یکدیگر ضعیف می‌باشد. دورگه‌های RNA-RNA از DNA-RNA، پایدارترند و این برتری باعث انتخاب شرایط شستشوی سخت‌تر و تولید سیگنال‌های بهتر می‌شود. سیگنال‌های حاصل، با حذف RNA های هیبرید نشده توسط RNase ها تقویت می‌شوند. یکی از مشکلات استفاده از ریبوپروب‌ها، سطوح بالایی از اتصالات غیرویژه این مولکول‌ها به اجزای بافتی است که می‌تواند منجر به افزایش پس‌زمینه و کاهش نفوذ پروب به درون بافت گردد. بنابراین تیمار پیش از دورگه‌سازی برای کاهش این عوامل مورد نیاز است.[۱و۵]

ج- پروب‌های الیگونوکلئوتیدی: الیگونوکلئوتیدهای کوتاه (۵۰-۲۰ جفت باز) به‌راحتی توسط دستگاه‌های خودکارِ سنتزکننده DNA ساخته می‌شوند. کوتاه بودن این توالی‌ها، امکان نفوذ پروب به درون برش‌های بافتی را تسهیل می‌نماید. طراحی یک الیگونوکلئوتید برای بخش معینی از mRNA، ویژگی پروب را افزایش می‌دهد.[۵] از مزایای این پروب‌ها پایداریِ مولکول‌های الیگونوکلئوتیدیِ تولید شده و نفوذ بافتی مناسب می‌باشد و چون این مولکول‌ها به‌صورت تک‌رشته‌ای تولید می‌شوند رقابتی بین دو رشته پروب برای دورگه‌سازی وجود ندارد. از معایب پروب‌های الیگونوکلئوتیدی، کاهش حساسیت به‌دلیل محدود بودن روش‌های نشاندار سازی و پایداری کم هیبریدها به‌دلیل طول کوتاه این پروب‌ها است.[۱]

تهیه و ساخت پروب:

روش‌های نشاندار کردن پروب‌ها: روش‌های فراوانی برای نشاندار کردن پروب‌ها وجود دارند:

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

الف- روش نشاندارسازی Nick translation: از قدیمی‌ترین و رایج‌ترین تکنیک‌های نشاندار سازی پروب‌ها می‌باشد. در این تکنیک از دو آنزیم DNase I و DNA پلیمراز I استفاده می‌شود. در حضور یون منیزیم Mg^{2+}، آنزیم DNase I به‌طور تصادفی پیوندهای فسفودی استر را در رشته‌های dsDNA هیدرولیز کرده و باعث ایجاد یک شکاف در طول یکی از رشته‌های dsDNA می‌شود. هولوآنزیم DNA پلیمراز I، با فعالیت‌های اگزونوکلئازی و پلیمرازی، نوکلئوتیدهای انتهای ′۳ شکاف را حذف می‌نماید و با الگو قرار دادن رشته‌ی دیگرِ DNA، نوکلئوتیدهای موجود در محلول را در محل شکاف قرار می‌دهد. میزان اتصال برچسب، می‌تواند توسط غلظت نوکلئوتیدهای نشاندار، غلظت DNA پلیمراز I و مدت زمان انجام واکنش کنترل گردد. اگر واکنش به‌صورت بهینه انجام گیرد، پروب‌های تولیدشده از طریق Nick translation می‌توانند بالاترین حساسیت را در مقایسه با پروب‌های نشاندار شده از طریق سایر روش‌ها، داشته باشند.

ب- روش آغازش تصادفی (Random priming): در این روش از قطعه‌ی بزرگ DNA پلیمراز I استفاده می‌شود. این قطعه فاقد فعالیت اگزونوکلئازی است. ابتدا DNA با استفاده از حرارت واسرشت می‌شود و هگزاداکسی‌ریبونوکلئوتیدهایی با توالی تصادفی به مخلوط اضافه می‌شوند. این توالی‌ها به DNA تک‌رشته‌ای، متصل شده و به‌عنوان پرایمر برای آنزیم DNA پلیمراز I عمل می‌کنند. با تغییر نسبت پرایمر به الگو، می‌توان طول رشته‌های DNA نشاندار را کنترل نمود، به‌طوری‌که در غلظت بالای پرایمر، توالی‌های نشاندار کوتاه و در غلظت پایین پرایمر، توالی‌های نشاندار بلند ایجاد می‌شوند. از مشکلات اصلی این روش، رقابت پروب‌های نشاندار با پروب‌های غیرنشاندار طی واکنش دورگه‌سازی است.

ج- End-tailing: در این روش ساده، آنزیم Terminal transferase بدون نیاز به رشته الگو، نوکلئوتیدهای نشاندار را به انتهای DNA تک‌رشته‌ای یا دورشته‌ای اضافه می‌کند. در این تکنیک تعداد کمی از نوکلئوتیدهای پروبِ حاصله نشاندار خواهند شد و امکانِ دورگه‌سازی متقاطع بین دُمِ نوکلئوتیدی تولیدشده با امتداد توالی‌های مکمل وجود دارد. این امر منجر به نشاندار شدن غیراختصاصی خواهد شد.

د- جایگزینی نوکلئوتیدها توسط آنزیم DNA پلیمراز T4: در این روش از آنزیم DNA پلیمراز T4 استفاده می‌شود. این آنزیم فعالیت‌های اگزونوکلئازی و پلیمرازی دارد و در غیاب نوکلئوتیدهای آزاد، فعالیت اگزونوکلئازی آن بسیار بالا بوده و در حضور نوکلئوتیدها این فعالیت مهار می‌شود. برای ایجاد پروب‌های نشاندار، dsDNA با آنزیم DNA پلیمراز T4 مخلوط می‌شود. در غیاب هر چهار نوکلئوتید، DNA پلیمراز T4 شروع به جدا کردن نوکلئوتیدها از انتهای ′۳ هر یک از رشته‌های DNA می‌کند. پس از مدت زمانی کوتاه، نوکلئوتیدهای نشاندار به مخلوط اضافه می‌شوند و DNA پلیمراز T4 با فعالیت پلیمرازی خود، شروع به قرار دادن آنها به‌جای نوکلئوتیدهای برداشت‌شده می‌نماید. محصول این روش، پروب‌های رشته‌های منحصر به فرد dsDNA با یک انتهای نشاندار هستند و از آنها برای تولید پروب‌های ssDNA می‌توان استفاده کرد.[1]

ه- نشاندار کردن پروب‌ها به‌طور مستقیم: این پروب‌ها از طریق قرارگیری نولکلئوتیدهای نشاندار شده با فلوروفورها و از طریق Nick translation یا Random priming تولید می‌شوند و فرایند اضافی، جهت آشکارسازی سیگنال‌ها مورد نیاز نمی‌باشد. پروب‌های CEP و LSI تولید شده با این روش (منفرد یا مخلوطی از پروب‌ها) به‌صورت تجاری در دسترس هستند و به‌طور معمول با فلوروفورهای قرمز، سبز یا زرد نشاندار می‌شوند.

و- نشاندار کردن پروب‌ها به‌طور غیرمستقیم: در این روش از نوکلئوتیدهای متصل به مولکول‌های گزارشگر مانند بیوتین و دیگوگسیژنین برای تولید پروب‌ها استفاده می‌شود. پروب‌های حاصل، پس از دورگه‌سازی نیازمند یک مرحله اضافی جهت آشکارسازی هستند. در این مرحله پروب با استفاده از آویدینِ نشاندار یا آنتی‌دیگوگسینِ نشاندار با فلوروفور قابل مشاهده می‌گردد. از معایب مهم این روش، افزودن مراحل اضافی به فرایند نشاندار کردن و از مزایای بالقوه آن، ایجاد سیگنال‌های قوی‌تر است، زیرا نشاندار کردن غیرمستقیم امکان ایجاد تغییرات بزرگتر در پروب را فراهم می‌آورد و فرد می‌تواند از این تکنیک برای مشاهده هر پروب نشاندار با ′۲-داکسی یوریدین ′۵- تری‌فسفات بیوتین‌دار، استفاده نماید.

ز- تهیه پروب در آزمایشگاه (In-House Developed Probes): بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی از پروب‌هایی استفاده می‌کنند که به‌صورت تجاری تهیه می‌شوند. در صورتی که یک پروب به‌طور تجاری در دسترس نباشد، پژوهشگر مجبور به ساخت آن در

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

آزمایشگاه می‌باشد. در این صورت تایید صحت عملکرد پروب، پیش از استفاده بالینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و باید از دورگه‌سازی آن با توالی هدف و ایجاد نتایج مورد انتظار در نمونه‌های سالم و بیمار اطمینان حاصل شود. به‌تازگی، توصیه‌هایی جهت تایید صحت عملکرد پروب‌ها برای استفاده‌های بالینی، ارایه شده‌اند.[۱۱]

ح- تولید ریبوپروب‌ها با بهره‌گیری از رونویسی در شیشه (in vitro): در این روش، توالی مورد نظر درون یک وکتور حاوی پروموتورهای رونویسی فاژی، کلون می‌شود. این پروموتورها می‌توانند رونویسی را در حضور RNA پلیمراز فاژی آغاز کنند. اگر پروموتورهای فاژی مختلف در دو طرف جایگاه‌های کلونینگ پلی‌لینکرِ وکتور و در دو جهت مخالف قرار گیرند، رونویسی انتخابی پروب‌های RNA سنس و آنتی‌سنس امکان‌پذیر می‌شود. رونویسی فقط یک رشته در یک زمان، از پیوند دوباره رشته‌های مکمل پروب (Reannealing)، طی فرایند دورگه‌سازی جلوگیری می‌کند.[۱]

برچسب‌های پروب: به‌طور معمول در روش ISH از مواد رادیواکتیو و غیررادیواکتیو برای نشاندار کردن پروب‌ها استفاده می‌شود. نشاندار کردن با مواد رادیواکتیو مزایای فراوانی دارد: رادیوایزوتوپ‌ها با استفاده از آنزیم‌ها به‌راحتی به پروب‌ها متصل می‌شوند، پروب‌های نشاندار شده با مواد رادیواکتیو حساس‌تر از پروب‌های نشاندار شده با مواد غیررادیواکتیو هستند و تجزیه و تحلیل کمّی را ممکن می‌سازند. نشاندار کردن با مواد رادیواکتیو به‌طور معمول شامل استفاده از نوکلئوتیدهای دارای ^{3}H, ^{32}P, ^{35}S است و از ^{14}C و ^{125}I نیز به‌میزان کمتری استفاده می‌شود. به‌طور کلی مشکلات استفاده از پروب‌های رادیواکتیو، شامل مدت زمان طولانی برای آشکارسازی، مسایل ایمنی و قرارگیری در معرض پرتوهای رادیواکتیو می‌باشند. سیستم‌های مختلفی جهت نشاندار کردن پروب‌ها با مواد غیررادیواکتیو وجود دارند. از جمله مواد غیررادیواکتیو مورد استفاده برای چنین هدفی بیوتین، فسفاتاز قلیایی، دیگوگسیژنین و مواد فلورسنت را می‌توان نام برد.[۵]

۲- آماده‌سازی نمونه: هدف اصلی از این مرحله، جلوگیری از حذف اسیدهای نوکلئوئیک در نمونه، حفظ مورفولوژی نمونه و افزایش نفوذ پروب درون آن می‌باشد.[۵] هنگام تثبیت بافت، متغیرهای گوناگون وجود دارند که باید مورد توجه قرار گیرند. زمانی که هدف، شناسایی سطوح mRNA باشد، سرعت بالای سنتز و تجزیه mRNA در حالت طبیعی باید مورد توجه قرار گیرد. علاوه بر این، مقدار بسیاری از mRNA ها، با افزایش استرس در حیوانات آزمایشگاهی، به‌طور قابل‌توجهی می‌تواند افزایش یابد. بنابراین برای جلوگیری از تغییر در میزان mRNA و تجزیه آن، حیوانات آزمایشگاهی باید با کمترین میزان استرس ذبح شوند و بافت به‌دست‌آمده به‌سرعت تثبیت گردد. در تمام فرایندها، بافت مورد نظر باید از آلودگی با RNase های موجود بر سطح پوست و ابزارهای آزمایشگاهی محافظت شود. روش‌های تثبیت بافت باید به‌گونه‌ای انتخاب گردند که دسترسی پروب به توالی هدف امکان‌پذیر باشد و حداکثر میزان DNA یا RNA و داده‌های مورفولوژی بافت حفظ شود.[۱] آماده‌سازی مطلوب یک بافت به‌طور معمول به‌طور تجربی شناخته می‌شود. بافت‌های تثبیت شده با پرفیوژن، انجماد و پارافین با موفقیت برای انجام ISH مورد استفاده قرار گرفته‌اند.[۵] بافت پس از شستشو در بافر فسفات نمکی یا PBS برای استفاده در فرایند ISH درون نیتروژن مایع منجمد می‌گردد. از عوامل مهم تعیین‌کننده روش تثبیت بافت، حفظ مورفولوژی بافت پس از دورگه‌سازی است. برخی از بافت‌ها مانند ریه، برای انجماد جهت مقطع‌گیری مناسب نیستند و نیازمند استفاده از پارافین برای حفظ مورفولوژی سلولی می‌باشند. بافت‌های آماده‌شده با پارافین، تقریبا ۲۵٪ از mRNA خود را از دست می‌دهند و این حذف و کاهش سیگنال برای بافت‌هایی که مقطع‌گیری از حالت منجمد شده آنها عملی نیست، پذیرفتنی می‌باشد.[۴] دو نوع تثبیت‌کننده (Fixative) برای تهیه بافت در روش ISH مورد استفاده قرار می‌گیرند:

۱) تثبیت‌کننده‌های رسوب‌دهنده مانند مخلوط اتانول و اسید استیک یا Carnoy's

۲) تثبیت‌کننده‌هایی که پیوستگی متقاطع تشکیل می‌دهند مانند پارافرمالدیید، فرمالدیید و گلوتارآلدیید.[۵]

میزان نفوذپذیری بافت، با توجه به نوع تثبیت‌کننده مورد استفاده، متفاوت خواهد بود. استفاده از تثبیت‌کننده‌های رسوب‌دهنده مانند مخلوط اسید استیک و الکل، نفوذ پروب به درون بافت را به‌میزان زیادی افزایش می‌دهد ولی در این روش، امکان تخریب RNA در بافت وجود دارد. گلوتارآلدیید، RNA و مورفولوژی بافت را حفظ می‌کند ولی به‌دلیل پیوند متقاطع با پروتیین‌ها، نفوذ پروب به درون بافت را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، تثبیت با پارافین و فرمالین

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

به‌علت اتصال متقاطع آنها با پروتیین‌ها یا تخریب mRNA، منجر به کاهش حساسیت می‌شود. جهت افزایش نفوذ پروب با استفاده از این روش‌ها، تیمار بافت با دترجنت‌ها یا پروتئازها ممکن می‌باشد ولی در این مورد نیز امکان حذفِ DNA یا RNA بافتی وجود دارد. موفق‌ترین تثبیت‌کننده، محلول پارافرمالدیید ٤٪ است.[٤] بافت پس از مقطع‌گیری درون پارافرمالدیید تثبیت می‌شود. از معایب این روش، دگرگونی مورفولوژی بافت است، ولی استفاده از بافت را برای هر دو فرایند ISH و استخراج DNA یا RNA ممکن می‌سازد.[۱]

۳- مرحله پیش از دورگه‌سازی: هدف از این مرحله آماده‌سازی نمونه برای پیوستن موثر پروب به DNA ی هدف، بدون آسیب قابل‌توجه به مورفولوژی بافت است. برش‌های بافتی برای جلوگیری از جابه‌جاییِ بافت، طی فرایندهای دورگه‌سازی و شستشو باید به‌خوبی به اسلایدهای شیشه‌ای بچسبند. چسب‌های Adhesives مختلفی مانند پلی‌إل‌لیزین (Poly-L-lysine)، ژلاتین کروم آلوم (Gelatin chrome alum) و aminopropyltriethoxysilane برای این منظور در دسترس می‌باشند. به‌دنبال چسبیدن برش‌های بافتی روی اسلاید، توالی هدف باید برای مولکول‌های پروب قابل دسترس باشد، این فرایند به‌ویژه در مورد بافت‌های تثبیت‌شده با پارافین بسیار مهم است. برداشتن ماسک پارافینی از برش‌های بافتی، ماسک‌برداری (Unmasking) نامیده می‌شود و نیازمند تیمار نمونه با آنزیم‌ها، شوینده‌ها یا دترجنت‌های مختلف می‌باشد.

برای مثال نمونه‌های تثبیت‌شده با پارافین، برای افزایش دسترسی پروب به DNA هدف، به‌طور عموم نیازمند تیمار با یک پروتئاز مانند پپسین می‌باشند. در این مورد باید هضم مناسب و کافی توسط پپسین، مورد توجه قرار گیرد. هضم بیش از حد، منجر به کاهش شدت سیگنال و تخریب مورفولوژی هسته می‌شود و هضم کمتر، باعث کاهش تعداد رونوشت‌های سیگنال می‌گردد. تیمار با اسید رقیق یا دترجنت‌های غیریونی، روش‌های دیگری هستند که برای تسهیل دخول پروب به درون سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. توانایی آنزیم‌های مختلف، از یک نوع به نوع دیگر و در مورد یک آنزیم منفرد از یک شرکتِ سازنده به شرکت دیگر متفاوت است. بنابراین رقیق‌سازی آنزیم برای هر سیستم آزمایشگاهی باید به‌طور اختصاصی صورت گیرد.[۲و۱۱]

٤- دورگه‌سازی و شستشو: دورگه‌سازیِ مولکولی فرایندی است که طی آن توالی هدفِ تک‌رشته‌ای به پروب تک‌رشته‌ای مکمل، متصل شده و یک هیبرید دو رشته‌ای تشکیل می‌دهد.[۱۱] پیش از دورگه‌سازی، مولکول هدف و پروب در صورت دو رشته‌ای بودن باید با استفاده از حرارت یا تیمار قلیایی، تک‌رشته‌ای شوند. به‌دنبال واسرشت‌سازی، توالی‌های تک‌رشته‌ای هدف و پروب برای دورگه‌سازی تحت شرایط بهینه انکوبه می‌شوند. فرایند دورگه‌سازی و شستشو تحت‌تاثیر عوامل مختلفی مانند ساختار پروب، دما، pH، غلظت فرمامید و غلظت نمک در بافر، قرار می‌گیرند.[۱۲]

به‌طور کلی، واکنش‌ها در دمای پایین و در حضور غلظت بالای نمک انجام می‌گیرند و غلظت پایین فرمامید در مخلوط دورگه‌سازی، منجر به کاهش ویژگی می‌شود. تحت شرایطی با سختگیری کمتر، ممکن است پروب با هومولوژی ۹۰-۷۰٪ به توالی هدف متصل‌شده و منجر به ایجاد سیگنال‌های غیراختصاصی شود.[۲] مخلوط دورگه‌سازی علاوه بر DNA پروب، حاوی نوعی از DNA به‌نام COT-DNA می‌باشد. این نوع DNA به توالی‌هایی با تکرار بالا که در کل ژنوم وجود دارند، متصل می‌شود. بدون COT-DNA، پروب به‌طور غیراختصاصی به توالی‌های تکراری متصل شده و منجر به ایجاد سیگنال‌های بسیار غیراختصاصی می‌شود. به‌دنبال دورگه‌سازی، اسلایدها با محلول ویژه شستشو داده می‌شوند. هدف از این مرحله حذف پروب‌هایی با اتصالات غیراختصاصی می‌باشد. اگر شرایط شستشوی بعد از دورگه‌سازی خیلی سخت باشد ممکن است تمام پروب یا بخش زیادی از آن شسته شده و از اسلاید حذف شود و در این حالت یا هیچ سیگنالی وجود ندارد یا سیگنال موجود بسیار ضعیف خواهد بود. از طرفی اگر شستشو به اندازه کافی سخت نباشد، مقادیر زیادی پس‌زمینه دورگه‌سازی هنگام مشاهده اسلایدها در زیر میکروسکوپ، وجود خواهد داشت.[۱۱]

۵- آشکارسازی (Detection): سنجش کمّی ماده هیستوشیمیایی در روش ISH، به نوع سیگنال ایجاد شده توسط سیستم آشکارساز بستگی دارد. برای پروب‌های رادیواکتیو، هیبریدها با استفاده از اتورادیوگرافی آشکار می‌شوند. به‌طور معمول برش‌های بافتی گاهی برای چند روز در معرض فیلم اشعه ایکس قرار می‌گیرند. اتورادیوگرافی براساس نشر سریع الکترون‌ها یا ذرات بتا از پروب می‌باشد. ذرات بتا زمانی که با اتم‌های امولسیون عکاسی برخورد

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

می‌کنند، مقدار زیادی انرژی آزاد می‌نمایند. این انرژی یون‌های نقره موجود در امولسیون را به نقره فلزی احیا می‌کند و ثبت دقیقی از موقعیت برخورد بین یک الکترون و یون‌های نقره در امولسیون در قالب یک تصویر ایجاد می‌شود. تصویر حاصل، نشان‌دهنده جایگاه پروب در بافت یا سلول است. اسلایدها برای مدت زمان مناسب (به‌طور مثال شش روز برای پروب‌های RNA نشاندار شده با ^{35}S) جهت تشکیل تصویر در تاریکی قرار داده می‌شوند. این تصویر در مراحل بعد با استفاده از فرایندهای عکاسی تثبیت می‌گردد.[۲] در مورد آشکارسازیِ پروب‌های غیررادیواکتیو، سیگنال با استفاده از یک آنزیم (مانند آلکالین فسفاتاز یا پراکسیداز تربچه کوهی) ایجاد می‌شود. این آنزیم متصل به پروب، با یک سوبسترای مناسب برای تشکیل محصول نامحلول رنگی واکنش می‌هد.[۱] پروب‌های نشاندار شده با بیوتین به دو روش می‌توانند شناسایی شوند:

۱) سیستم‌های مبتنی بر آویدین، که از میل ترکیبی بالای آویدین به بیوتین بهره می‌گیرند، ۲) استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه بیوتین. یک آنتی‌بادی علیه دیگوگسین برای آشکارسازی پروب‌های نشاندار با دیگوگسیژنین مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس شناسایی بر واکنشِ متقاطع بین آنتی‌بادی‌های آنتی‌دیگوکسین و دیگوگسیژنین است. سیستم‌های آشکارساز تک‌مرحله‌ای و تقویت‌شده قابل دسترس می‌باشند. در آشکارسازی تک‌مرحله‌ای، آنزیم نشانگر (مانند آلکالین فسفاتاز یا پراکسیداز تربچه کوهی) به‌طور مستقیم به آنتی‌بادی اولیه یا آویدین متصل شده و با سوبسترای خود برای تولید یک محصول رنگی، واکنش می‌دهد. انواع مختلف روش‌ها می‌توانند برای تقویت سیگنال‌ها استفاده شوند.[۲] از جمله این روش‌ها می‌توان به Catalyzed reporter deposition (CARD) و تکنولوژی DNA شاخه‌دار (Branched DNA technology) اشاره نمود.[۳]

روش CARD برای تقویت سیگنال‌ها در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی،[۱۳] میکروسکوپ ایمونوالکترون و ISH به‌کار می‌رود. در این روش از تیرآمین بیوتینیله استفاده می‌شود و باعث افزایش قابل‌توجه حساسیتِ تشخیص مقادیر کمی از آنتی‌ژن‌های پروتیینی می‌گردد. اساس این روش مبتنی بر واکنش میان آنتی‌بادی ثانویه بیوتینیله علیه آنتی‌بادی اولیه با کمپلکس بیوتین-استرپتوآویدین، بیوتینیل تیرآمید (عامل تقویت) و استرپتوآویدین پراکسیداز می‌باشد. رنگ‌آمیزی با یک ماده رنگ‌زا مانند دی‌آمینوبنزیدین (DAB) کامل می‌گردد. این روش برای اولین‌بار برای تقویت در روش الایزا (ELISA)[۱۴-۱۹] و وسترن‌بلات[۲۰و۲۱] مورد استفاده قرار گرفت.[۲۲]

روش CARD حساسیت سیگنال‌های ISH را در مقایسه با روش‌های آویدین-بیوتین حدود ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر افزایش می‌دهد. این روش پس از دورگه‌سازی و شستشو انجام می‌گیرد، بنابراین ویژگی پروب را تحت‌تاثیر قرار نمی‌دهد و انجام آن راحت و سریع می‌باشد. انجام ISH همراه با تقویت سیگنال توسط CARD، گزینه مناسبی برای شناسایی رونوشت‌های کم تعداد اسیدهای نوکلئیک و آنتی‌ژن‌ها در محل می‌باشد. روش دیگر تقویت سیگنال، تکنولوژی DNA شاخه‌دار است. در این روش از یک سری پروب‌های الیگونوکلئوتیدی غیرایزوتوپ استفاده می‌شود که یکی پس از دیگری برای تولید سیگنال‌های رنگ‌زا و فلورسنت هیبرید می‌شوند. روش DNA شاخه‌دار می‌تواند با یک مجموعه پروب برای شناسایی DNA یا mRNA به‌کار رود. این روش بسیار اختصاصی بوده و سیگنال را تقویت می‌کند.[۳]

۶- روند کنترل: یکی از جنبه‌های چالش‌برانگیز برای تایید صحت نتایج حاصل از فرایند ISH، انتخاب کنترل مناسب است. به‌کار بردن فرایندهای کنترلی متعدد برای اطمینان از اختصاصی بودن برچسب مشاهده‌شده برای توالی هدف، اهمیت بسیاری دارد.[۱و۴] از جمله فرایندهای کنترلیِ مورد استفاده توسط محققان می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱) پیش‌تیمار بافت‌ها با RNase یا DNase، با توجه به نوع مولکول هدف، ۲) حذف پروب‌های اختصاصی در واکنش دورگه‌سازی، ۳) استفاده از پروب‌های سنس یا پروب‌های نامرتبط، ۴) بررسی واکنش‌های رقابتی با پروب‌های غیرنشاندار، پیش از افزودن پروب‌های نشاندار جهت انجام دورگه‌سازی، ۵) دورگه‌سازی نورترن یا ساترن برای مشخص نمودن نوع اسید نوکلئیک موجود در هیبریدها و ۶) ترکیب ISH با رنگ‌آمیزی ایمنی (Immunostaining) برای تعیین موقعیت محصول پروتیینی در سلول‌های یکسان. از طرفی طی فرایند ISH بررسی یکپارچگی RNA هدف اهمیت زیادی دارد. از دست دادن RNA یا تخریب پروب‌ها برای ردیابی RNA هدف، ممکن است منجر به نتایج منفی کاذب به‌ویژه در مورد مطالعات گذشته‌نگر بافت‌های تثبیت‌شده با پارافین، شود. برای ارزیابی حفظ mRNA، پروب‌های

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

کنترلی که مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل بتااکتین، poly(dT) و RNA های ریبوزومی می‌باشند.[۱۲]

انواع دورگه‌سازی در محل:

۱- دورگه‌سازی در محل با مواد فلورسنس: ظهور دورگه‌سازی در محل با مواد فلورسنس (Fluorescence In Situ Hybridization FISH) در دهه ۱۹۸۰ انقلاب دیگری را در تجزیه و تحلیل سیتوژنتیکی ایجاد نمود. روش FISH به‌عنوان تکنیکی جهت شناسایی تریزومی‌ها و جابه‌جایی‌ها در هسته‌های متافازی و اینترفازی با استفاده از کتابخانه‌های DNA معرفی گردید. این تکنیک ابزار بسیار مناسبی برای مطالعه ساختار و عملکرد کروموزوم‌ها، پلی‌پلوییدی، انیوپلوییدی، دخول ژن بیگانه، تکامل ژنوم و تعیین نقشه فیزیکی ژن‌ها می‌باشد. در بسیاری از کاربردها، ISH نیازمند روش‌های موثری جهت آماده‌سازی کروموزوم‌ها است، به‌گونه‌ای که کروموزوم‌ها باید به‌خوبی حفظ شده و توزیع مناسبی داشته باشند.[۲۳] در FISH از DNA پروب‌های نشاندار با مواد فلورسنت جهت تعیین جایگاه‌های کروموزومی درون هسته استفاده می‌شود. مواد فلورسنت سیگنال‌های رنگی ایجاد می‌کنند و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مورد شناسایی قرار می‌گیرند. برخلاف تجزیه و تحلیل کاریوتایپ متافازی حاصل از روش‌های سیتوژنتیکی معمول، در تکنیک FISH نیازی به کشت سلول نیست و برای انجام آن می‌توان به‌طور مستقیم از سلول‌ها و بافت‌های تازه یا بافت تثبیت‌شده با پارافین جهت ارزیابی سریع استفاده نمود.

در سال‌های اخیر، همراه با کشف تعداد بی‌شماری از ژن‌های مرتبط با بیماری‌ها، کاربردهای FISH در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، بدخیمی‌های خونی و تومورها گسترش یافته است. برای مثال تشخیص جابه‌جایی BCR/ABL1، تکثیر بیش از حد ژن HER2 و نوآرایی ALK با استفاده از FISH، جهت درمان هدفمند لوسمی میلوییدی مزمن، سرطان پستان و آدنوکارسینومای ریه از اهمیت زیادی برخوردار است. بنابراین آزمون‌های FISH به‌عنوان مولفه‌های اساسی پزشکی منحصر به شخص (Personalized Medicine) مورد تایید قرار گرفته‌اند.[۲۴]

برای انجام تکنیک‌های FISH، طیف گسترده‌ای از نمونه‌ها شامل خون محیطی، بافت تثبیت‌شده با پارافین یا نمونه‌های سیتولوژی (مانند ادرار، بزاق) می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. بافت منجمد، کارایی مناسبی ندارد زیرا منجمد کردن باعث تشکیل بلورهای یخ درون سلول می‌شود که مورفولوژی سلول را تغییر می‌دهد. فرمالین، تثبیت‌کننده‌ای است که بهترین نتایجِ FISH را برای بافت تثبیت‌شده با پارافین ارایه می‌دهد. البته اگر بافت قبل از قرارگیری در پارافین، برای مدت طولانی (بیش از ٤٨ ساعت) در فرمالین قرار گیرد، نتایج مناسبی حاصل نخواهد شد. هنگام انجام فرایند FISH روی نمونه‌های تثبیت‌شده با B5، دستیابی به نتایج مطلوب‌تر، ممکن است نیازمند جداسازی هسته پیش از انجام FISH باشد. اصول کلی فرایند FISH مشابه اصول ISH است و برای آشکارسازی سیگنال‌ها از میکروسکوپ فلورسنت با فیلترهای مناسب استفاده می‌گردد.[۱۰] پروب‌های به‌کار رفته در FISH با یک فلوروکروم یا یک هاپتین نشاندار شده‌اند که فلوروکروم، شناسایی مستقیم پروب از طریق یک سیگنال رنگی را در محل دورگه‌سازی ممکن می‌سازد و هاپتن باعث شناسایی غیرمستقیم پروب می‌شود. برای شناسایی مستقیم از مولکول‌های گزارشگر مانند FITC، رودامین، Texas Red، Cy2، Cy3، Cy5 استفاده می‌گردد. بیوتین، دیگوگسیژنین و دی‌نیتروفنل مولکول‌های گزارشگری هستند که به‌طور معمول برای شناسایی غیرمستقیم به‌کار می‌روند.[۲۵]

انواع FISH:

الف- Fiber FISH: کاربرد تکنیک‌های FISH بر روی DNA پروتیین‌زدایی‌شده، Fiber FISH نامیده می‌شود. اغلب، DNA هدف با پروتیین‌زدایی کروماتین توسط دترجنت‌ها یا غلظت بالای نمک، به‌دست می‌آید. چنین تیماری، هیستون‌ها را از کروماتین حذف کرده و منجر به باز شدن کامل DNA به مارپیچ خطی دو رشته‌ای می‌شود. در بسیاری از دستورکارها، استخراج کروماتین با استفاده از تیمار تمام سلول‌ها در محل، روی اسلایدهای میکروسکوپ انجام می‌گیرد. تکنیک‌های Fiber FISH بیشتر به‌عنوان روش‌های تکمیلی برای تعیین نقشه فیزیکی مناطق کروموزومی، به‌کار می‌روند. این امر ممکن است شامل تعیین ترتیب یک سری کلون‌های ژنومی (کاسمیدها، کروموزوم‌های مصنوعی باکتریایی) روی قطعه‌ای از DNA متوالی باشد. این تکنیک همچنین ممکن است برای مطالعه همانندسازی DNA در کروموزوم‌های مصنوعی مخمر استفاده گردد. قدرت تفکیک Fiber FISH بسیار بالا بوده و می‌تواند کمتر از یک کیلو باز باشد. اما میکروسکوپ نوری توانایی تفکیک آن را ندارد چرا که یک کیلو باز معادل ۳٤۰ nm در رشته DNA باز شده است. این

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

روش نسبت به روش‌های قدیمیِ تعیین نقشه، زمان کمتری را برای به‌دست آوردن داده‌ها نیاز دارد. دستورکارهای زیادی برای انجام Fiber-FISH روی سلول‌های پستانداران در دسترس هستند. مهمترین مرحله در این فرایند، استخراج هسته و کروماتین برای رهاسازی و پخش DNA روی اسلاید می‌باشد.[۲۶]

ب- FISH کمّی (Quantitative FISH): تلومرها، توالی‌های تکراری DNA در انتهای هر کروموزوم هستند که باعث پایداری کروموزوم شده و از اتصال دو انتهای کروموزوم به یکدیگر جلوگیری می‌کنند. برای درک مکانیسم‌های کوتاه شدن تلومر، ایجاد روش‌هایی برای اندازه‌گیری دقیق طول تلومر در بافت‌های تازه و بایگانی شده ضروری است. سه روش برای اندازه‌گیری طول تلومرها وجود دارد که عبارتند از ساترن بلات، Q-FISH و Flow-FISH.[۲۷]

روش Q-FISH یک تکنیک سیتوژنتیکی مبتنی بر FISH است که در آن از پروب‌های نشاندار شده با مواد فلورسنس (مانند Cy3 یا FITC) برای کمّی کردن توالی‌های هدف در DNA کروموزومی توسط میکروسکوپ فلورسنت و نرم‌افزارهای تحلیل‌گر، استفاده می‌شود. علاوه بر این Q-FISH برای کمّی کردن توزیع طول تلومر، مرتبط با بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگرچه این تکنیک داده‌های دقیقی در مورد طول تلومرها در اختیار قرار می‌دهد ولی کاربرد آن می‌تواند از طریق ترکیب با سایر تکنیک‌هایِ مرتبط با FISH مانند Flow-FISH که مبتنی بر فلوسایتومتری است، گسترش یابد. در Flow-FISH، از فلوسایتومتری برای اندازه‌گیری شدت فلورسنس در مجموعه‌ای از سلول‌ها استفاده می‌شود، در حالی‌که در Q-FISH، شدت فلورسنس در تعداد محدودتری از سلول‌ها اندازه‌گیری می‌گردد. برخلاف Q-FISH، روش Flow-FISH قادر به تعیین طول تلومر در یک کروموزوم خاص درون یک سلول واحد نمی‌باشد.

اگرچه Q-FISH بازدهی کمی دارد و برای پژوهش‌های جمعیتی مناسب نمی‌باشد ولی پژوهشگران دستورکارهایی با بازدهی بالا ارایه کرده‌اند که از دستگاه‌های کامپیوتری برای انجام Q-FISH استفاده می‌کنند. به‌طور مشابه سایر روش‌ها مانند FISH چندگانه و FISH چند رنگی نیز می‌توانند در ترکیب با Q-FISH مورد استفاده قرار گیرند. در FISH چندگانه، از چندین پروب برای مشاهده چندین کروموزوم در رنگ‌های مختلف و برای شناسایی نوآرایی‌های کروموزومی استفاده می‌شود. روش Q-FISH در شناسایی پیوندهای تلومری (محل اتصال انتهای کروموزوم‌ها به یکدیگر در ناحیه تلومر) کاربرد دارد.

این اتصالات گاهی توالی‌های تلومریِ بینابینی کروموزومی (Interstitial chromosome telomere sequences, ITS) نامیده می‌شوند و مطالعه آنها اغلب نشان‌دهنده دوره تکاملی است. برای مثال یکی از کروموزوم‌های انسان حاوی یک توالی ITS می‌باشد و هیبریدی از دو کروموزوم متصل‌شده در شامپانزه است. مشاهده تنظیم طول تلومر در گونه‌های مختلف مانند انسان و سایر حیوانات، داده‌های ارزشمندی را در مورد تکامل کاریوتایپ و ارتباط آن با بیماری‌های انسان آشکار می‌سازد.[۲۸]

ج- Flow FISH: یکی دیگر از تکنیک‌های اندازه‌گیری طول تلومرها Flow-FISH می‌باشد. در این تکنیک برای اندازه‌گیری طول متوسط تکرارهای تلومر از پروب‌هایی به‌نام پروب‌های اسیدنوکلئیکِ پپتیدی (Peptide Nucleic Probes, PNA) استفاده می‌شود. افزایش صحت و تکرارپذیری اندازه‌گیری‌ها توسط نمونه‌برداری خودکار و یک استاندارد داخلی (سلول‌های کنترل) همراه با طول معینی از تلومر در هر لوله، صورت می‌پذیرد.[۲۹] در این تکنیک پروب PNA با استفاده از FITC نشاندار شده و با توالی‌های تکرارهای تلومر هیبرید می‌شود و اندازه‌گیری فلورسنت در سلول‌های مختلف توسط فلوسایتومتری انجام می‌گیرد. در مقایسه با اندازه‌گیری طول تلومر توسط ساترن بلات، این روش می‌تواند طول تلومر را در زیرجمعیت‌های مختلفی از سلول‌ها درون یک نمونه، یا در چندین نمونه با تعداد کمی از سلول‌ها به‌طور همزمان اندازه‌گیری نماید. این روش نسبت به Q-FISH زمان کمتری نیاز دارد. مطالعه طول تلومرها توسط Flow-FISH در لنفوسیت‌ها، سلول‌های میلوییدی و گرانولوسیت‌های انسان، موید توان بالا و سودمندی این تکنیک بوده است.[۳۰]

د- Single molecule RNA FISH: تکنیکی برای شناسایی و اندازه‌گیری mRNA و سایر مولکول‌های RNA طویل در نمونه‌های بافتی است. جایگاه‌های هدف، می‌توانند با به‌کار بردن چندین پروب الیگونوکلئوتیدیِ کوتاه، مشاهده شوند. این پروب‌ها به‌طور دقیق به جایگاه هدف متصل می‌شوند و زمانی که هر پروب به mRNA تک‌رشته‌ای متصل شد، با حالت هم‌افزایی (Cooperative) باعث باز شدن تاخوردگی‌های مولکول mRNA و اتصال برچسب‌های فلورسنت بیشتری به آن می‌شود. اتصال این پروب‌ها، فلورسنس کافی برای تعیین موقعیت هر mRNA هدف را در تصویر میکروسکوپ فلورسنت فراهم

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

می‌آرود. این تکنیک در تجزیه و تحلیل بیان ژن، تشخیص سرطان و در مطالعات علوم اعصاب کاربرد دارد.[۲۸]

ه- رنگ‌آمیزی کروموزوم با چند رنگ و FISH چند رنگی: رنگ‌آمیزی کل کروموزوم با چند رنگ (Multicolor whole chromosome painting) یا کاریوتایپینگ طیفی (Spectral karyotyping) یا SKY و FISH چند رنگی (Multicolor FISH)، تکنیک‌های بسیار پیشرفته‌ای هستند که امکان ایجاد کاریوتایپ کدگذاری‌شده با رنگ را فراهم می‌آورند. ایجاد رنگ برای هر کروموزوم، با نشاندار کردن پروب‌های ویژه آن کروموزوم و فقط با پنج فلوروفور انجام می‌گیرد. روش‌های SKY و M-FISH در شناسایی کروموزوم‌هایی با تشخیص دشوار، مانند کروموزوم‌های مارکر یا کروموزوم‌هایی با نوآرایی‌های پیچیده مورد استفاده قرار می‌گیرند. این تکنیک‌ها برای شناسایی ژنتیک تومورهای سفت بسیار سودمند هستند زیرا تومورهای سفت، اغلب کاریوتایپ‌های پیچیده‌ای با توضیح دشوار دارند.[۱۱]

و- FISH و آزمایشگاه تراشه‌ای (Lab on a chip): امروزه تراشه‌های میکروفلوییدی وجود دارند که FISH اینترفازی را به‌صورت خودکار درآورده‌اند. برخلاف FISH معمولی، کار با این تراشه‌ها فقط چند دقیقه زمان نیاز دارد. اگرچه FISH اینترفازی یک روش تشخیصیِ حساس برای شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومی می‌باشد، هزینه هر آزمون و پیچیدگی فنی پروتکل‌های FISH، استفاده گسترده از این روش را محدود ساخته است. آزمایشگاه تراشه‌ای یا تجهیزات ریزسیال، حاوی شبکه‌هایی از میکروکانال‌ها است، به‌گونه‌ای که می‌تواند تکنیک‌های تحلیلی متعددی را روی تراشه‌ها گنجانده و آنها را به‌صورت خودکار درآورد. از آنجایی که میکروکانال‌ها کنترل سیاله را در سطح بسیار پیچیده (کمتر از پیکولیتر) ممکن می‌سازند، از مزایای این تجهیزات می‌توان به زمان کوتاه جهت تجزیه و تحلیل، هزینه پایین، حداقل نیاز به مداخله انسانی و دسترسی آسان به آنها در کاربردهای بالینی اشاره کرد. امروزه، FISH روی ریزسیال‌های شیشه‌ای انجام می‌گیرد و نتایج قابل تکرار و دقیقی ارایه می‌دهد.

در مقایسه با روش‌های متداول، FISH روی تراشه، ۱۰ برابر بازدهی بیشتری داشته، ۱۰ برابر هزینه آزمون را می‌کاهد و سنجش همزمان چندین ناهنجاری کروموزومی یا چندین بیمار را ممکن می‌سازد. تعیین نوع و اندازه ناهنجاری کروموزومی توسط آزمون‌های تشخیصی، جهت تشخیص آگاهانه و انتخاب مناسب استراتژی‌های درمانی، ضروری است. تکنیک FISH روی تراشه، با توجه به مزایای گفته‌شده، آزمون ژنتیکی را به‌طور گسترده‌ای در زمینه بالینی در دسترس قرار خواهد داد.[۱و۲۸و۳۱]

مزایا و معایب FISH: حساسیت، تکرارپذیری، ویژگی و بازدهی بالای FISH، توانایی آزمایشگاه‌های سیتوژنتیک و آسیب‌شناسی را افزایش داده است. مدت زمان مورد نیاز برای انجام FISH چهار تا ۲٤ ساعت است و ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ سلول را در مدت ۱۵ تا ٤۵ دقیقه آنالیز می‌کند. تکنیک‌های FISH امکان مطالعه ناهنجاری‌های کروموزومی را در سلول‌هایی که در حال تقسیم نیستند، فراهم می‌آورد و بنابراین برای مشاهده ناهنجاری‌های کروموزومی به‌طور مستقیم در نمونه‌های سیتولوژیکی و برش‌های بافتی سودمند هستند. این امر منجر به تعیین نقشه کروموزومی مناطق حذف یا مضاعف‌شده در انواع مختلف تومورها شده است. یکی از معایب مهم FISH، ناتوانی آن در تشخیص ناهنجاری‌های کروموزومی ناشناخته است. از طرفی تکنیک‌های FISH به‌عنوان آزمون‌های غربالگری برای تشخیص نوآرایی‌های کروموزومی نمی‌توانند مورد استفاده قرار گیرند، زیرا این تکنیک‌ها توانایی شناسایی جابه‌جایی‌های متعادل را ندارند.[۲۵]

کاربردهای FISH:

کاربردهای تشخیصی: شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومیِ خاص، شناسایی کروموزوم‌های مارکر، بررسی پیشرفت بیماری، بررسی موفقیت پیوند مغز استخوان، کاربردهای پژوهشی: تعیین نقشه ژنتیکی، شناسایی مناطق حذف یا مضاعف‌شده، شناسایی نقاط شکست در جابه‌جایی‌ها، مطالعه سه‌بعدی سازمان‌یافتگیِ کروموزوم‌ها در هسته اینترفازی.

۲- دورگه‌سازی در محل با مواد رنگی غیررادیواکتیو: دورگه‌سازی در محل با مواد رنگی غیررادیواکتیو (Chromogenic in situ hybridization, CISH) نوع دیگری از ISH است که بسیار شبیه FISH می‌باشد با این تفاوت که در این تکنیک پروب بعد از دورگه‌سازی، با استفاده از یک واکنش رنگ‌زا مشاهده می‌گردد. راه‌های گوناگونی برای انجام CISH وجود دارند. یکی از این روش‌ها اتصال dUTP بیوتینیله به پروب می‌باشد. پس از اتصال پروب به مولکول هدف، استرپتوآویدین نشاندار شده با پراکسیداز تربچه

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

کوهی، به اسلاید اضافه می‌گردد. استرپتوآویدین به بیوتین متصل می‌شود و سپس دی‌آمینوبنزیدین اضافه شده و پراکسیداز تربچه کوهی آن‌را به یک رنگ قهوه‌ای در جایگاه پروب تبدیل می‌کند. در تکنیک دیگری از CISH پروب‌های نشاندار شده با دیگوگسیژنین به‌جای پروب‌های نشاندار شده با بیوتین استفاده می‌شوند، اما در اینجا نیز برای مشاهده پروب، آنزیم پراکسیداز و DAB به‌کار می‌روند. روش CISH مزایای فراوانی را نسبت به FISH دارد. یکی از مزایای اصلی، امکان مشاهده اسلایدهای CISH توسط میکروسکوپ نوری و تشخیص ساختار بافت است. علاوه بر این، CISH می‌تواند همراه با ایمونوهیستوشیمی برای سنجش ارتباط بین تغییرات کروموزومی و بیان ژن، مورد استفاده قرار گیرد. اسلایدهای تهیه‌شده در این تکنیک، پایداری بالایی دارند و پس از تجزیه و تحلیل، برای نگهداری و بایگانی طولانی‌مدت مناسب هستند. یکی از معایب CISH توانایی تشخیص فقط یک سیگنال در یک زمان است و سیگنال‌های تولیدشده با CISH نسبت به سیگنال‌های تولیدشده با FISH گسستگی کمتری دارند و باعث کاهش دقت در تعیین شماره سیگنال می‌گردد.

اهمیت ناتوانی CISH در شناسایی یک هدف، با توجه به کاربرد آن، ممکن است متفاوت باشد. برای مثال CISH به‌طور متداول برای شناسایی ویروس‌هایی مانند EBV یا ویروس سیتومگال در بافت ریه به‌کار می‌رود و در این کاربرد خاص، ناتوانی CISH برای شناسایی بیش از یک سیگنال هدف، محدودیت حساب نمی‌شود. اما در برخی از کاربردهای دیگر، ناتوانی در شناسایی بیش از یک سیگنال در یک زمان، می‌تواند محدودیت ایجاد نماید. برای مثال در نوعی آزمون تجاریِ FISH از دو پروب (یک پروب سبز برای سانترومر کروموزوم ۱۷ و یک پروب قرمز برای ژن HER2) استفاده شده است. با چنین آزمونی اگر نسبت سیگنال HER2 به CEP17 بیش از دو باشد، نشان‌دهنده تکثیر ژن HER2 و توجیهی برای درمان با هرسپتین است. علت اساسی استفاده از پروب CEP17 در این مجموعه پروب‌ها، پلی‌زومی کروموزوم ۱۷ در برخی از تومورها است. در مواردی که بیش از دو رونوشت از ژن HER2 وجود داشته باشد و زیاد بودن تعداد رونوشت‌های ژن HER2 ناشی از تقویت آن نباشد دانستن نسبت‌ها، با استفاده از آزمون CISH امکان‌پذیر نیست.[۱۱و۳۲]

۳- دورگه‌سازی ژنومی در محل (Genomic in situ hybridization, GISH): در این تکنیک از کل DNA ژنومی به‌عنوان پروب استفاده می‌شود و تفاوت‌های قابل‌توجهی را در ژنوم گونه‌های مختلف (به‌ویژه در گیاهان) نشان می‌دهد.[۸] زمانی که هدف، شناسایی کروموزوم‌های والدی در یک دورگه‌سازی بین گونه‌ای یا در ژنوم معینی از یک پلی‌پلوییدی باشد، کل ژنوم یکی از والدین به‌عنوان پروب، نشاندار می‌شود. ژنوم والد دوم (غیرنشاندار)، به‌عنوان DNA مسدودکننده (Blocking DNA) با هدف جلوگیری از دورگه‌سازی‌های غیراختصاصی ناشی از تشابه ژنوم‌های دو والد به‌کار می‌رود. بنابراین ژنوم هر دو والد (نشاندار و غیرنشاندار) باید به‌طور همزمان در یک محلول دورگه‌سازی وجود داشته باشند. نسبت پروب به DNA مسدودکننده، جهت جلوگیری از آشکارسازی ژنوم والد دوم، باید مناسب باشد.[۸و۳۳] این تکنیک توانایی شناسایی تمام ژنوم و قطعات ژنومی بیگانه را دارد و می‌تواند برای اهداف زیر مورد استفاده قرار گیرد: ۱) شناسایی ژنوم گونه‌های مختلف در هیبریدها ۲) تعیین اجدادِ گونه‌ها ۳) بررسی جابه‌جایی ژن‌های بیگانه ٤) رنگ‌آمیزی کروموزوم و سیتوژنتیک تشخیصی ۵) توضیح ارتباط گونه‌ها از طریق دورگه‌سازی متقاطع پروب.[۸]

٤- دورگه‌سازی قیاسی ژنوم (Comparative genomic hybridization, CGH): روشی قدرتمند، مشابه کاریوتایپینگ معمولی است که جهت تجزیه و تحلیل ناهنجاری‌های کروموزومی در کل ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، DNA از بافت تومور و بافت طبیعی جداسازی و به‌ترتیب با فلوروفورهای سبز و قرمز نشاندار می‌شود. مقادیر مساوی از DNA نشاندار سبز و DNA نشاندار قرمز با یک گستره متافازی طبیعی (کاریوتایپ بدون هیچ ناهنجاری) هیبرید می‌شوند. اگر در بافت تومور ناهنجاری کروموزومی وجود نداشته باشد مقادیر مساوی از پروب‌های سبز و قرمز به کروموزوم‌های موجود در گستره متافازی طبیعی متصل شده و رنگ تمام کروموزوم‌ها در این گستره زرد خواهد شد (چون مقادیر مساوی از پروب‌های قرمز و سبز، رنگ زرد را می‌سازند).

اگر برای نمونه سه رونوشت از کروموزوم یک در تومور موجود باشد، رنگ سبز بیش از رنگ قرمز خواهد بود و کروموزوم یک در گستره متافازی به رنگ سبز ظاهر خواهد شد. در مورد مضاعف‌شدگی نیز به‌همین صورت خواهد بود و منطقه‌ای از کروموزوم که مضاعف شده است به رنگ سبز خواهد بود، در حالی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

که منطقه‌ای که در آن حذف رخ داده، به رنگ قرمز دیده خواهد شد.[۱۱و۳۷-۳٤] امروزه CGH به‌طور معمول با گستره متافازی انجام نمی‌گیرد و به‌جای آن از تراشه‌های کلون‌های DNA مربوط به تمام مناطق موجود در طول ۲٤ کروموزوم استفاده می‌شود. این تکنیک آرایه CGH نامیده می‌شود و قدرت تفکیک و تکرارپذیریِ آن نسبت به CGH معمولی بیشتر است.[۱۱و۳۹-۳٤] CGH مزایای گوناگونی را نسبت به کاریوتایپینگ معمولی دارد، در این روش: ۱) نیازی به کشت سلول‌های تومور نیست، ۲) ضرورتی به متافازی بودن سلول‌ها جهت شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومی وجود ندارد، ۳) قدرت تفکیک آن بالا و در حدود Mb ۱ است، در حالی که قدرت تفکیک کاریوتایپینگ معمولی پایین و در حدود Mb ۵ است. تنها عیب این روش نسبت به کاریوتایپینگ معمولی این است که CGH نمی‌تواند ناهنجاری‌های کروموزومی متعادل (مانند جابه‌جایی متقابل) را شناسایی کند. اگرچه CGH به‌طور معمول کاربرد بالینی نیافته است، ولی روش قدرتمندی برای شناسایی بسیاری از ناهنجاری‌های شایع در انواع مختلف تومورها (برای مثال سرطان ریه) می‌باشد.[۱۱و۳۷-۳٤]

کاربردهای دورگه‌سازی در محل: دورگه‌سازی در محل کاربردهای گوناگونی در زمینه‌های مختلف بالینی و تشخیصی دارد که برخی از آنها عبارتند از:

۱) ردیابی یا شناسایی عوامل عفونت: بسیاری از پروب‌ها از جنس DNA برای شناسایی ژن‌های بیگانه مانند ژن‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی در برش‌های بافتی در دسترس می‌باشند،[۱۲] ۲) بررسی بیان ژن: روش‌های ISH ابزاری قدرتمند برای تجزیه و تحلیل بیان ژن در بافت‌های آسیب‌دیده می‌باشند. از مزایای اصلی ISH تعیین موقعیت mRNA در سطح سلولی در تومورهای ناهمگون است، ۳) مطالعه رشد و نمو سلول: ردیابی RNA اختصاصی سلول توسط ISH، در سلول‌هایی که تمایز ریخت‌شناسی نشان نمی‌دهند می‌تواند در شناسایی نوع سلول سودمند باشد، ٤) تعیین جنسیت: کروموزوم Y می‌تواند از طریق هیبریداسیون با pHY2 نشاندار (یکی از تکرارهای اختصاصی در کروموزوم Y) ردیابی شود. این فرایند، تکنیک مناسبی برای تعیین جنسیت پیش از تولد و تعیین جنسیت در صورت ابهام جنسی از نظر فنوتیپی می‌باشد، ۵) تعیین نقشه ژنتیکی انسان: دورگه‌سازی پروب با کروموزوم‌های متافازی امکان مشاهده ژن‌ها بر روی کروموزوم‌ها را فراهم می‌سازد، ٦) سیتوژنتیک اینترفازی: ISH می‌تواند برای تشخیص ناهنجاری‌های عددی کروموزومی در هسته اینترفازی مورد استفاده قرار گیرد،[۲] ۷) از کاربردهای رایج ISH استفاده آن برای ردیابی سلول‌های سرطانی در نمونه‌های سیتولوژیکی، بررسی تغییرات کروموزومی در برش‌های بافتی و بررسی پاسخ به درمان در انواع معینی از سرطان‌ها است،[۱۱] ۸) به‌دلیل حساسیت بالای این روش، حتی mRNA های کدکننده گیرنده‌های غشایی را نیز می‌توان با استفاده از آن مشاهده نمود. تعیین موقعیت mRNA های اختصاصی سلول، داده‌هایی را در مورد مکانیسم‌های بیماری ارایه می‌دهد و در تایید مدل‌های حیوانی سودمند است.[٤۰]

بحث

پیشرفت‌های جدید در زمینه زیست‌شناسی سلولی و پژوهش در خصوص سرطان منجر به پیشرفت‌های بسیاری در تشخیص و غربالگری بالینی خواهند شد. این اکتشافات، درمان‌های جدیدی را پیشنهاد کرده و نیاز به آزمون‌های تشخیصی جهت ارزیابی بیان نامناسب یا غیرطبیعی ژن‌های تازه کشف‌شده در بافت‌های آسیب‌دیده را برآورده خواهند ساخت.

در حال حاضر، برای بسیاری از مارکرهای تشخیصی و پیش‌آگهی‌دهنده، ژن‌های جدیدی کشف نشده‌اند. بنابراین ایجاد روش‌های جدید با کاربردهای گسترده، سریع و کم‌هزینه، جهت توسعه آزمون‌های تشخیصی با هدف بررسی تغییر بیان ژن، ضروری به‌نظر می‌آید. استفاده از ایمونوهیستوشیمی (آزمون‌های تشخیصی با استفاده از واکنش آنتی‌بادی‌ها در بافت‌های تثبیت‌شده با پارافین)، شناسایی بیان ژن‌های هدف را به‌صورت پروتیین ممکن می‌سازد، ولی ژن‌های برخی از آنتی‌بادی‌ها در حال حاضر در دسترس نیستند. در روش‌های جدید نیازی به تکنیک‌های متناوب تشخیص بیان ژن درون برش‌های بافتی وجود نخواهد داشت. دورگه‌سازی در محل چنین امکانی را فراهم ساخته و نقش آن در آزمون‌های تشخیصی و پژوهش‌های بالینی، برای توسعه عصر جدیدی از پزشکی مولکولی ادامه خواهد یافت.[۱۰] در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، استفاده از این روش در آینده‌ای نزدیک، جهت تعیین تغییر در بیان ژن‌ها در هر سلولی، روندی رایج و سودمند خواهد شد.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

References

1. Kumar A. In situ hybridization. *Int J Appl Biol Pharmaceutical Technol* 2010;1(2):418-30.
2. Meng L, Leng Ph. In situ hybridisation: principles and applications. *Malaysian J Pathol* 1992;14(2):69-76.
3. Jensen E. Technical Review: In Situ Hybridization. *Anat Rec* 2014;297(8):1349-53.
4. Wilcox JN. Overview of in situ hybridization methodology. Workshop-Visualizing Neoplasia (meeting of the histochemical society). Winship Cancer Institute, Emory University, Atlanta, Syllabus, 2000.
5. Nakamura RM. Overview and principles of in-situ hybridization. *Clin Biochem* 1990;23(4):255-9.
6. Wilk R, Murthy SUM, Yan H, Krause HM. In situ hybridization: fruit fly embryos and tissues. *Curr Protocol Essential Lab Tech* 2010;Suppl 4:9.3.1-24.
7. Eisel D, Seth O, Grünewald-Janho S, Kruchen B. DIG Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization. 4th ed. Saarbrücken: Roche Diagnostics GmbH; 2008.
8. Lavania UC. Fluorescence in situ hybridization in genome, chromosome and gene identification in plants. *Curr Sci* 1998;74(2):126-33.
9. Coulton GR, Belleroche J. In Situ Hybridization: Medical Applications. 2nd ed. Dordrecht: Springer Netherlands; 1992.
10. Hicks DG, Longoria G, Pettay J, Grogan T, Tarr S, Tubbs R. In situ hybridization in the pathology laboratory: general principles, automation, and emerging research applications for tissue-based studies of gene expression. *J Mol Histol* 2004;35(6):595-601.
11. Halling KC, Wendel AJ. In situ hybridization: principles and applications. In: Cagle PT, Allen TC, editors. Basic Concepts of Molecular Pathology, Molecular Pathology Library. 1st ed. New York, NY: Springer Science and Business Media; 2009. p. 109-18.
12. Jin L, Lloyd RV. In situ hybridization: methods and applications. *J Clin Lab Anal* 1997;11(1):2-9.
13. Bahari A, Aarabi M, Aarabi M, Hedayati M, Jarollahi A, Firouzi F, et al. Diagnostic value of antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-Saccharomyces cerevisiae antibody in Iranian patients with inflammatory bowel disease. *Acta Gastroenterol Belg* 2009;72(3):301-5.
14. Hedayati M, Yaghmaei P, Pooyamanesh Z, Zarif Yeganeh M, Hoghooghi Rad L. Leptin: a correlated Peptide to papillary thyroid carcinoma? *J Thyroid Res* 2011;2011:832163.
15. Hedayati M, Ordookhani A, Daneshpour MS, Azizi F. Rapid acid digestion and simple microplate method for milk iodine determination. *J Clin Lab Anal* 2007;21(5):286-92.
16. Hedayati M, Salehi Jahromi M, Zarif Yeganeh M , Daneshpour MS, Hoghooghi Rad L, Azizi F. Association between serum level of anti-TPO titer and polymorphisms G1193/C Exon 8 and C214 /T Exon 12 of thyroid peroxidase gene in an Iranian population. *Int J Endocrinol Metab* 2010;8(2):62-67.
17. Ghaemmaghami S, Hedayati M, Mohaddes SM, Gorgian Mohammadi M, Barkhordari A. Resistin effect on HCT-116 colorectal cancer cells proliferation and telomerase expression. *Scimetr* 2014;2(2):e16718.
18. Gorgian Mohammadi M, Hedayati M, Zarghami N, Ghaemmaghami S, Mohaddes M. Adipocyte derived hormones gene expression, resistin and visfatin, in AGS gastric cancer cell line. *Iran J Cancer Prev* 2013;6(3):165-9.
19. Faam B, Zarkesh M, Daneshpour MS, Azizi F, Hedayati M. The association between inflammatory markers and obesity-related factors in Tehranian adults: Tehran lipid and glucose study. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17(8):577-82.
20. Rajabi H, Gharakhanlou R, Dehkhoda M, Hedayati M, Salehkiya M. Effect of eight weeks of resistance training on amount of presynaptic P/Q type α-1A calcium channel in rat soleus and FHL muscles. *J Movement Sci Sport* 2012;4(20):1-9.
21. Gaeeni AA, Khaledi N, Ravasi AA, Saheb moghadam lotfi A, Hedayati M, Arabkori V, Sadrolashrafi S. Response of skeletal muscle sarcomer proteins to increasing strength training in rats. *Olympics J* 2011;4(56):125-37. [Persian]
22. Sanno N, Osamura RY. Catalyzed reporter deposition method for amplifying endocrine products. *Endocr Pathol* 1998;9(3):195-9.
23. Andres RJ, Kuraparthy V. Development of an improved method of mitotic metaphase chromosome preparation compatible for fluorescence in situ hybridization in cotton. *J Cotton Sci* 2013;17:149-56.
24. Hu L, Ru K, Zhang L, Huang Y, Zhu X, Liu H, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomark Res* 2014;2(1):3.
25. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Biosci Horizons* 2010;3(1):85-95.
26. Ersfeld K. Fiber-FISH: Fluorescence in situ hybridization on stretched DNA. Methods *Mol Biol Parasit Genom Protoc* 2004;270:395-402.
27. O'Sullivan JN, Finley JC, Risques RA, Shen WT, Gollahon KA, Rabinovitch PS. Quantitative fluorescence in situ hybridization (QFISH) of telomere lengths in tissue and cells. *Curr Protoc Cytom* 2005;Chapter 12:Unit 12.6.
28. Alam Khan F. Biotechnology in Medical Sciences. 1st ed. Dubai: CRC Press; 2014.
29. Baerlocher GM, Vulto I, de Jong G, Lansdorp PM. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc* 2006;1(5):2365-76.
30. Baerlocher GM, Mak J, Tien T, Lansdorp PM. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. *Cytometry* 2002;47(2):89-99.
31. Sieben VJ, Debes-Marun CS, Pilarski LM, Backhouse CJ. An integrated microfluidic chip for chromosome enumeration using fluorescence in situ hybridization. *Lab Chip* 2008;8(12):2151-6.
32. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2000;2(3):116-23.
33. Brammer SP, Vasconcelos S,Poersch LB, Oliveira AR, Brasileiro-Vidal AC. Genomic in situ hybridization in Triticeae: A methodological approach. In: Andersen SB. Plant Breeding from Laboratories to Fields. 1st ed. Copenhagen: InTech; 2013. p. 3-22.
34. Ashman JN, Brigham J, Cowen ME, Bahia H, Greenman J, Lind M, et al. Chromosomal alterations in small cell lung cancer revealed by multicolour fluorescence in situ hybridization. *Int J Cancer* 2002;102(3):230-6.
35. Kim TM, Yim SH, Lee JS, Kwon MS, Ryu JW, Kang HM, et al. Genome-wide screening of genomic alterations and their clinicopathologic implications in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11(23):8235-42.
36. Chujo M, Noguchi T, Miura T, Arinaga M, Uchida Y, Tagawa Y. Comparative genomic hybridization analysis detected frequent over representation of chromosome 3q in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2002;38(1):23-9.

37. Peng WX1, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Matsuno Y, Asamura H, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of high-grade neuroendocrine tumors of the lung. *Cancer Sci* 2005;96(10):661-7.
38. Jansen FA1, Blumenfeld YJ, Fisher A, Cobben JM, Odibo AO, Borrell A, et al. Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45(1):27-35.
39. Emy Dorfman L, Leite JC, Giugliani R, Riegel M. Microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances. J Pediatr (Rio J). 2015 Jan-Feb;91(1):59-67.
40. Wilson KH, Schambra UB, Smith MS, Page SO, Richardson CD, Fremeau RT, et al. In situ hybridization: identification of rare mRNAs in human tissues. *Brain Res Brain Res Protoc* 1997;1(2):175-85.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

TUMJ Tehran University Medical Journal, June 2015; Vol. 73, No. 3: 143-157 Review Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:36 IRST on Thursday February 22nd 2018

In situ hybridization; principles and applications: *review article*

Zahra Nozhat Ph.D. Candidate
Mehdi Hedayati Ph.D.*

Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: P.O. box: 1985717413, Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-22432498
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

Received: 10 Dec. 2014 Accepted: 10 Mar. 2015 Available online: 10 May 2015

Abstract

In situ hybridization (ISH) is a method that uses labeled complementary single strand DNA or RNA to localize specific DNA or RNA sequences in an intact cell or in a fixed tissue section. The main steps of ISH consist of: probe selection, tissue or sample preparation, pre-hybridization treatment, hybridization and washing, detection and control procedure. Probe selection is one of the important aspects of successful hybridization. ISH sensitivity and specificity can be influenced by: probe construct, efficiency of labeling, percentage of GC, probe length and signal detection systems. Different methods such as nick translation, random priming, end tailing and T4 DNA polymerase replacement are used for probe generation. Both radioactive and non-radioactive labels can be used in order to probe labeling. Nucleic acid maintenance in samples, prevention of morphological changes of samples and probe penetration into tissue section are the main aims of sample preparation step. Then, a small amount of solution containing probe, is added on slides containing tissue sections for hybridization process, then slides are incubated overnight. Next day, washes are carried out to remove the probes which are not bound to target DNA or RNA. Finally, in order to be sure that the observed labeling is specific to the target sequence, using several control procedures is very important. Various techniques based on ISH consist of: Fluorescence in situ hybridization (FISH), chromogenic in situ hybridization (CISH), genomic in situ hybridization (GISH), comparative genomic hybridization (CGH), spectral karyotyping (SKY) and multiplex fluorescence in situ hybridization (MFISH). One of the most common techniques of ISH is fluorescence in situ hybridization. FISH can be used to: 1) detect small deletions and duplications that are not visible using microscope analysis, 2) detect how many chromosomes of a certain type are present in each cell and 3) confirm rearrangements that are suspected after microscope analysis. In this technique different fluorescent labels are attached to the probes. In this review article ISH, its different types, their application, advantages and disadvantages have been considered.

Keywords: comparative genomic hybridization, DNA probes, in situ hybridization, molecular probes.