

معرفی تست ژنتیکی (FISH(CISH و کاربرد آن

RNA در کروموزوم های متافازی، سلول های ایتترفازی و قطعات بافتی است و از پروپ های فلوروسنتی استفاده می کند که تنها به بخش هایی از کروموزوم متصل می شود. ورود این تکنیک به سیتوژنتیک منجر به شناسایی علت بسیاری از سندرم های ناشی از ریزحذف ها مثل سندرم ویلیام-برن و ریزحذف 1P36 شد و همچنین اولین سندرم ناشی از ریز مضاعف شدگی ها در ناحیه 22q11,2 نیز شناسایی شد.

مراحل انجام این تکنیک FISH (شکل ۱) بطور خلاصه شامل پیش تیمار سلول های تثبیت شده روی لام با محلول های نمکی و چند دترجنت برای حذف پس زمینه اضافی و نفوذپذیر ساختن سلول ها سپس جدا کردن دو رشته DNA هم پروپ و هم کروموزوم به طوری که آنها بتوانند به همدیگر متصل بمانند. در مرحله بعد پروپ بر روی اسلاید قرار داده می شود و یک لامل شیشه ای بر روی آن گذاشته می شود. برای جلوگیری از تبخیر آن لبه های لامل با چسب مهروموم می شود. سپس اسلاید در انکوباتور (۳۷ درجه سانتیگراد) در مدت یک شب قرار داده می شود تا پروپ ها با جایگاه های مکمل خود روی کروموزوم هدف هیبرید شوند. در طول شب، DNA پروپ توالی هدف خود را در کروموزوم خاص جستجو می کند و به آن متصل می شود. روز بعد لامل برداشته می شود و اسلاید در محلول دترجنت یا نمک شسته می شود تا هر پروبی که به کروموزوم متصل نشده است برداشته شود. در آخر یک رنگ فلوروسنت متمایز به اسلاید اضافه می شود تا کل کروموزوم ها رنگ بگیرند. به طوری که آنها با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت قابل مشاهده و آنالیز شوند. رنگ هایی که به طور معمول برای رنگ آمیزی کروموزوم های متافازی

امروزه علم ژنتیک و مباحث پیرامون آن به طور گسترده در علوم مختلف و بویژه در حوزه علوم پزشکی (تحقیقاتی و بالینی) نفوذ قابل توجهی داشته است. با توجه به شیوع بالای بیماری های ژنتیکی ارثی و غیر ارثی به ویژه در کشور ما که شیوع ازدواج های فامیلی نسبتا بالا است، کاربرد انواع تست های ژنتیکی در زمینه های تشخیص، درمان، پیش آگهی و بسیاری از حوزه های دیگر اهمیت بسزایی یافته است. تست های ژنتیکی به تمام روش ها و تکنیک هایی گفته می شود که به شناسایی اختلالات ژنتیکی کمک می کند. هدف این تست ها فراهم کردن اطلاعات کافی از توالی DNA است تا بتوان پس از ارزیابی آن، جهش ها و واریانت های درگیر در یک اختلال ژنتیکی را کشف کرد. تست های ژنتیکی در دو حوزه سیتوژنتیک و ژنتیک مولکولی تقسیم بندی می شوند که تست (FISH (CISH جزء دسته سیتوژنتیک قرار دارد که در اینجا مختصر توضیح داده می شود.

هیبرید سازی فلوروسانت درجا (FISH)

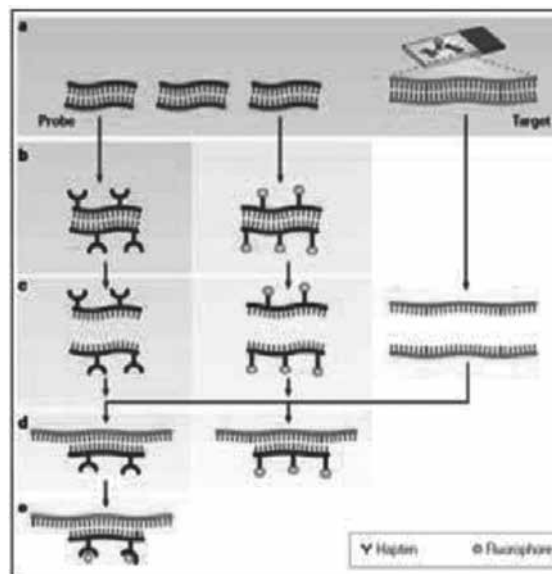
در سال ۱۹۷۷ نخستین شناسایی فلوروسنت وابسته به آنتی بادی اسیدهای نوکلئیک به دست آمد. در سال ۱۹۸۰ نخستین شناسایی در جا به کمک نشانگرهای فلوروسانت صورت گرفت. زمانی که به طور مستقیم با فلوروفور نشاندار شد و به RNA انتهای ۳ پریم به عنوان یک پروپ برای توالی های DNA خاص به کار گرفته شد. هیبرید سازی فلوروسانس درجا (FISH)، در این سال بعنوان یک تکنیک استاندارد معرفی شد که آغازی برای سیتوژنتیک مولکولی بود. FISH روشی است که طی آن نمونه به صورت همراه و یا جدای از پروپ های DNA کنترل با کروموزوم های متافازی هیبرید شده تا انواعی از اختلالات تعدادی و ساختاری شناسایی شود. واژه فلوروسانت به معنای ساطع شدن نور از یک مولکول فلوروفر پس از تحریک آن است و In Situ اشاره به این حقیقت دارد که این متد با کروموزوم، سلول یا بافتی انجام می شود که روی یک اسلاید میکروسکوپی تثبیت شده است. هدف این تکنیک پیدا کردن توالی های DNA یا

۱. پروپ هایی که به لکوس خاصی متصل می شوند.
۲. پروپ هایی که به توالی های تکراری سانترومیک متصل می شوند.
۳. پروپ هایی که به نواحی تلومریک متصل می شوند.
۴. پروپ هایی که کل کروموزوم را رنگ آمیزی می کنند.

بسته به اینکه از چه نوع کاوشگرهایی و با چه هدفی استفاده شود، امروزه انواع مختلفی از FISH معرفی شده است و همچنان نیز بر تعداد آن افزوده می شود. یکی از انواع آن فیش چندگانه است که در آن کاوشگرهایی با رنگ های مختلف به طور همزمان برای ردیابی چند ژن مختلف استفاده می شود. این فن قدرت تفکیک خوبی (در حد ۴۰ تا ۲۵۰ کیلوباز) دارد اما به اطلاعات قبلی در مورد توالی نیاز دارد، همچنین زمان بر بوده و کل ژنوم را اسکرین نمی کند. همچنین SKY نیاز به یک گسترده کروموزومی نوعی محدودیت محسوب می شود.

منابع:

1. Raapak. Overview of Fluorescence In Situ Hybridization Techniques for Molecular Cytogenetics. Current Protocols in Cytometry 1997; 8.1.1-8.1.6.
2. Levisky J, Mand Singer RH. Fluorescence in situ hybridization past, present and future. J Cell Sci 2003; 116: 2833-2838.
3. O'Connor C. Fluorescence in situ hybridization (FISH). Nat Edu 2008; 1 (1):171.
4. Liehr T, Claussen U. Multicolor-FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics. Curr Genomics 2002; 3 (3): 213-235.
5. Madon PF, Athalye AS, Sanghavi K, Parikh FR. Microdeletion Syndromes Detected by FISH –73 Positive from 374 Cases. Int J Hum Genet 2010; 10(1-3): 15-20.



شکل ۱: طرحی شماتیک از مراحل کلی انجام فرایند دور که سازی فلوئورسانت درجا (FISH) به دو روش مستقیم و غیر مستقیم.

یا هسته های ایتترفازی استفاده می شود عبارتند از پروپیدیوم یدید (PI) و دی آمینو فنیل ایندو (DAPI) که بسته به رنگ کاوشگرهای بکار گرفته شده رنگی که تمایز بیشتری ایجاد کند مورد استفاده قرار می گیرد همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود، دو روش کلی برای برچسب دار کردن پروپ ها وجود دارد. در روش مستقیم رنگ فلوئورسنت یا فلوئوروکروم به طور مستقیم به پروپ متصل می شود ولی در روش غیرمستقیم یک مولکول هاپتن به نوکلئوتیدهای خاصی از پروپ متصل می شود و محل اتصال فلوئوروکروم را به پروپ مشخص می کند. پس در این روش از یک عامل کمکی استفاده می شود و نمی گذاریم نشان دار به طور مستقیم به پروپ متصل شود در این تکنیک معمولاً چهار نوع کاوشگر مختلف از نظر محل اتصال آنها وجود دارند و توالی هایی از DNA که در تهیه هریک از انواع کاوشگرها استفاده می شوند نیز متفاوت است.

ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی را در فضای مجازی دنبال کنید:

@tashkhis_magazine

tashkhis_magazine

www.tashkhis.com

tashkhis magazine