

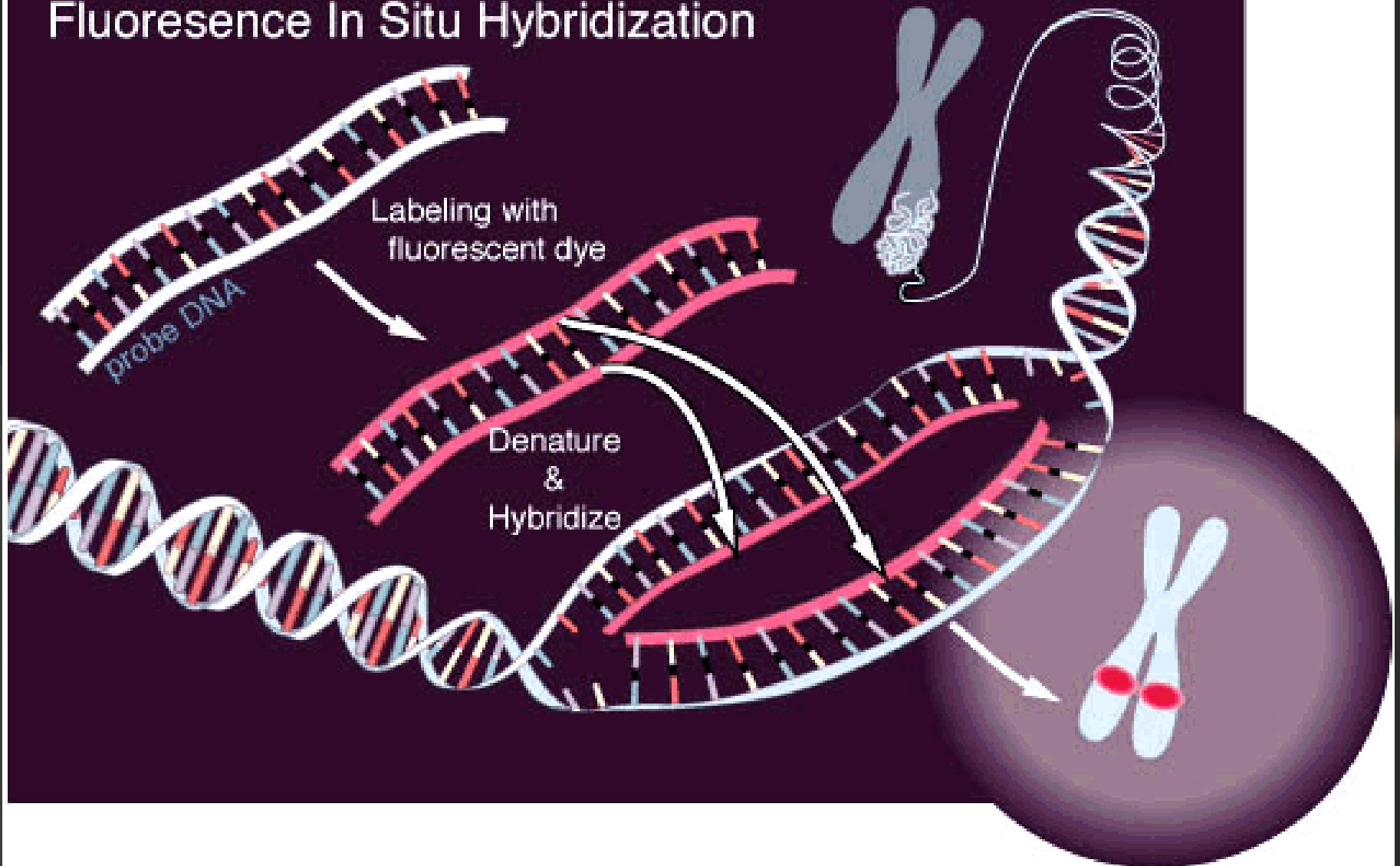
Možnost přípravy DNA sond pro FISH

Biofyzikální ústav AV ČR, Brno
Laboratoř molekulární cytologie a cytometrie

Jana Kroupová, Eva Bártová, Stanislav Kozubek, Andrea Harničarová



Fluorescence In Situ Hybridization



Fluorescenční in situ hybridizace

FISH

přímá



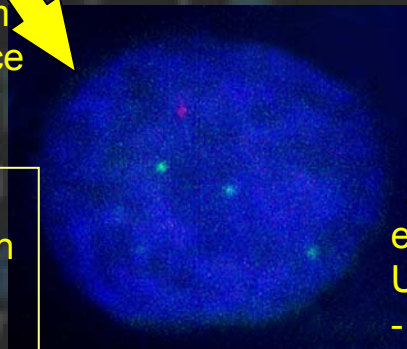
denaturace hybridizace



vazba sondy na cílené úseky DNA

promytí, kontrastní dobarvení jádra

excitace UV světlem - vizualizace



nepřímá



denaturace hybridizace



vazba sondy na cílené úseky DNA

promytí



vazba fluorescenční barvy na reportérovou molekulu

promytí, kontrastní dobarvení jádra

excitace UV světlem - vizualizace

značení DNA sondy:

reportérová molekula: digoxigenin, biotin

sekundární protilátky:

Rhodamin-anti-DIG

FITC-avidin

barvení jádra:

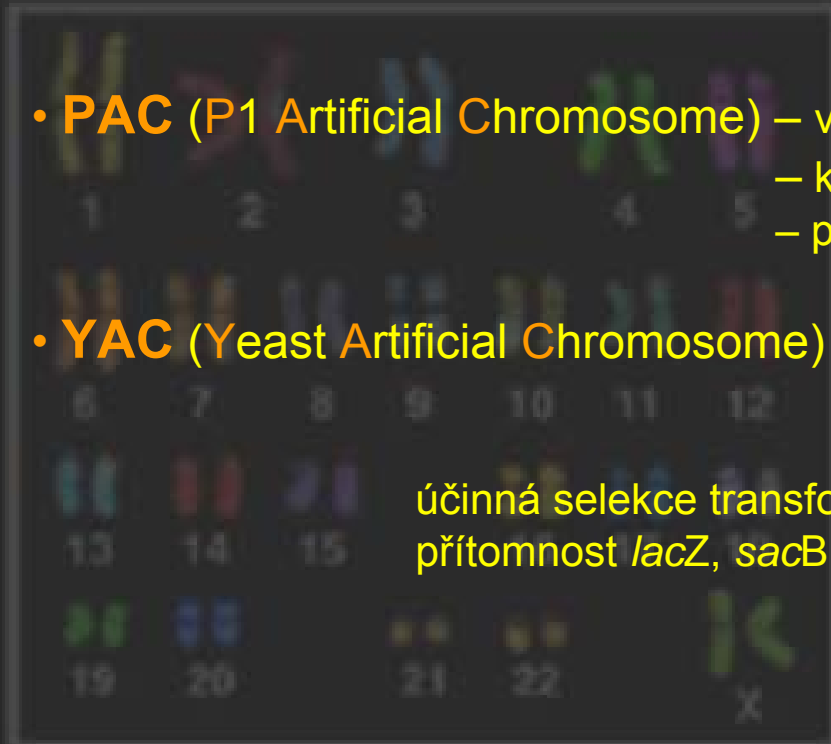
DAPI (4',6-diamidin-2'-fenylyndol)

TO-PRO®-3 iodide

PI (propidium iodide)

Zdroje DNA pro přípravu sond

- **BAC** (Bacterial Artificial Chromosome) – struktura odvozena od F-plazmidů bakterie *Escherichia coli*
 - klonovací kapacita 50-350 kb
 - malý počet kopií 1-2
- **PAC** (P1 Artificial Chromosome) – vektor odvozen od temperovaného fága P1
 - klonovací kapacita 130 - 150 kb
 - počet kopií 1-20
- **YAC** (Yeast Artificial Chromosome) – často vytváří chiméry
 - klonovací kapacita až 500 kb
 - účinná selekce transformovaných organismů – rezistence na antibiotika, přítomnost *lacZ*, *sacB* ...



Příprava DNA sondy

- izolace DNA z příslušného BAC nebo PAC klonu *E. coli*
izolace klasickou metodou s vlastními roztoky nebo izolačním kitem
izolace kitem je výhodnější (větší výtěžek, odstranění bakteriální DNA)

ověření čistoty a koncentrace vyizolované DNA

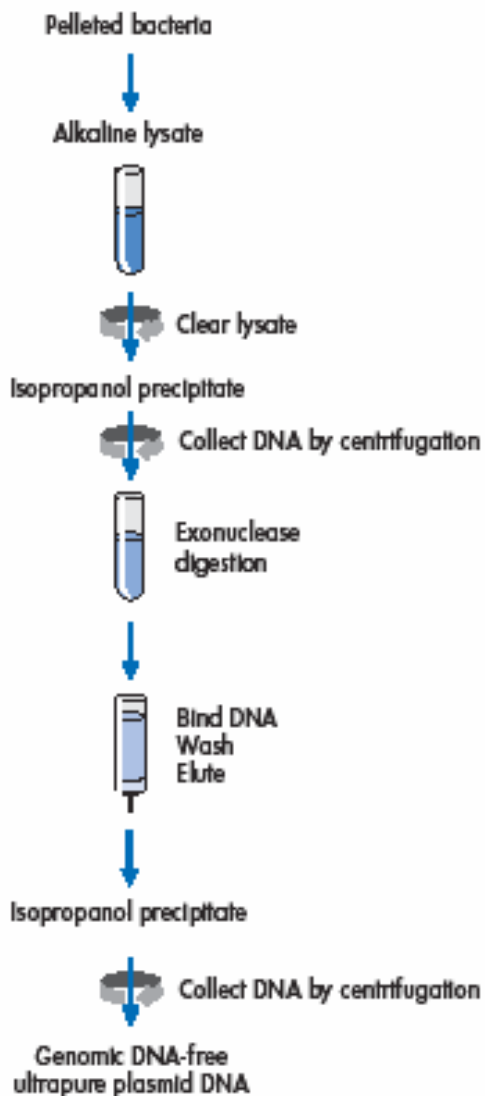
- označení DNA – Nick-translace – nahrazením nukleotidů DNA nukleotidy nesoucí reportérové molekuly (Dig, Biotin)
- zvýšení specifičnosti DNA sondy vystíněním repetitivních sekvencí



Izolace DNA z příslušného BAC nebo PAC klonu *E. coli*

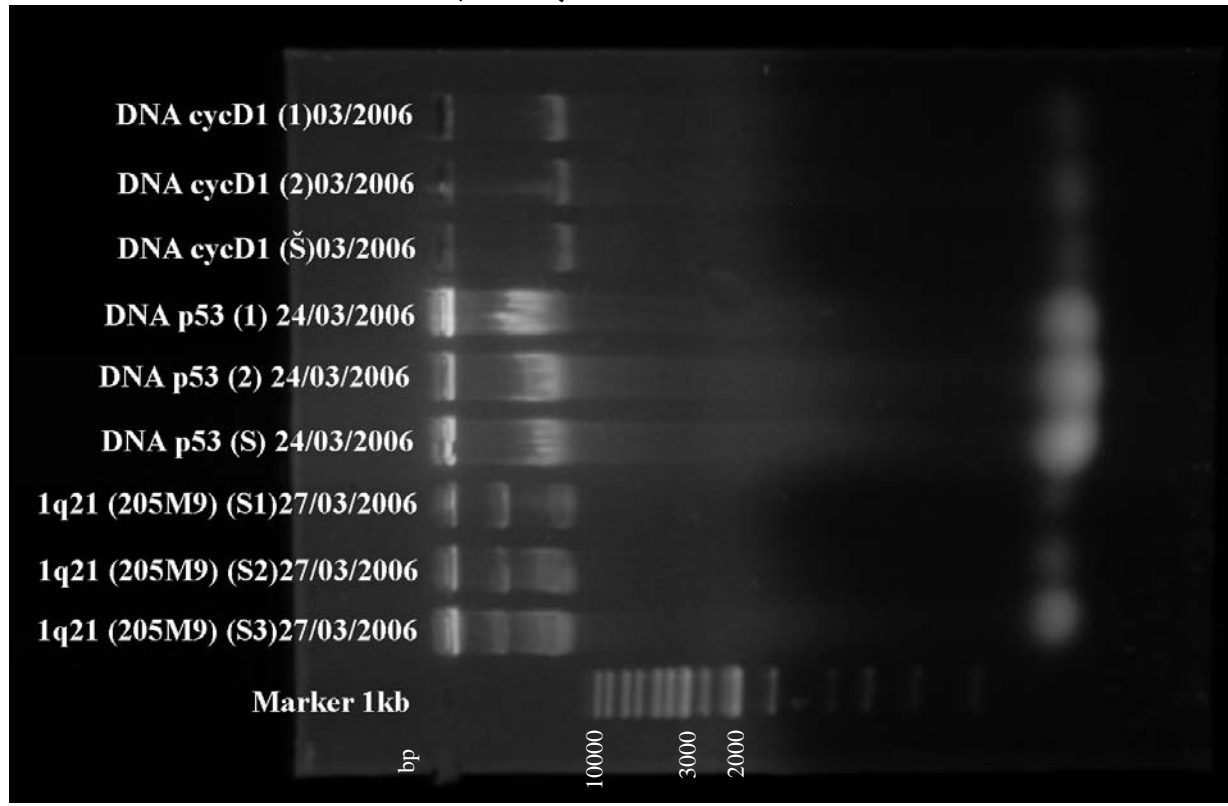
- resuspendace bakterií
- kombinací pufrů lýza bakterií a precipitace jejich genomové DNA, proteinů, buněčných zbytků
- oddělení precipitátu centrifugací a filtrací
- vysrážení DNA z roztoku izopropanolem, přesrážení etanolem
- přečistění DNA od bakteriální DNA a RNA (v kolonkách promytí pufrům s ATP-dependentními exonukleázami a promývacími pufrů)
- rozpuštění DNA v TE pufru nebo H₂O
- ověření čistoty a koncentrace DNA pomocí gelové elektroforózy a spektrofotometrie

QIAGEN Large-Construct Kit Procedure



Ověření čistoty a koncentrace DNA

bakteriální DNA
plazmidová DNA



Nick translace (popsal Rigby et al., 1977)

DNáza I – vytváří zlomy v DNA

***E. coli* polymeráza I** – v 5'→3' směru nahrazuje umožňuje vložení reportérových molekul do DNA řetězce (15°C)

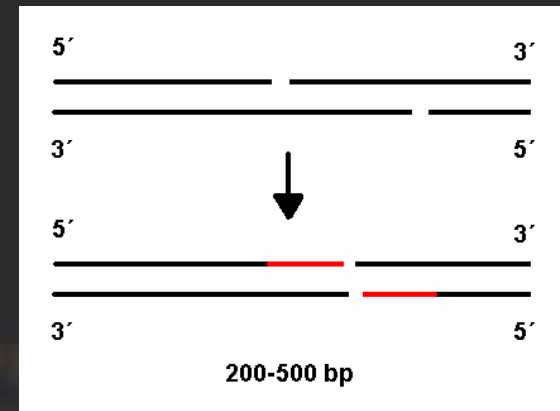
→ každý 20.-25. nukleotid nese reportérovou molekulu (digoxigenin, DIG-11-dUTP nebo biotin, Biotin-16-dUTP)

vznik fragmentů o velikosti 200-500 bp

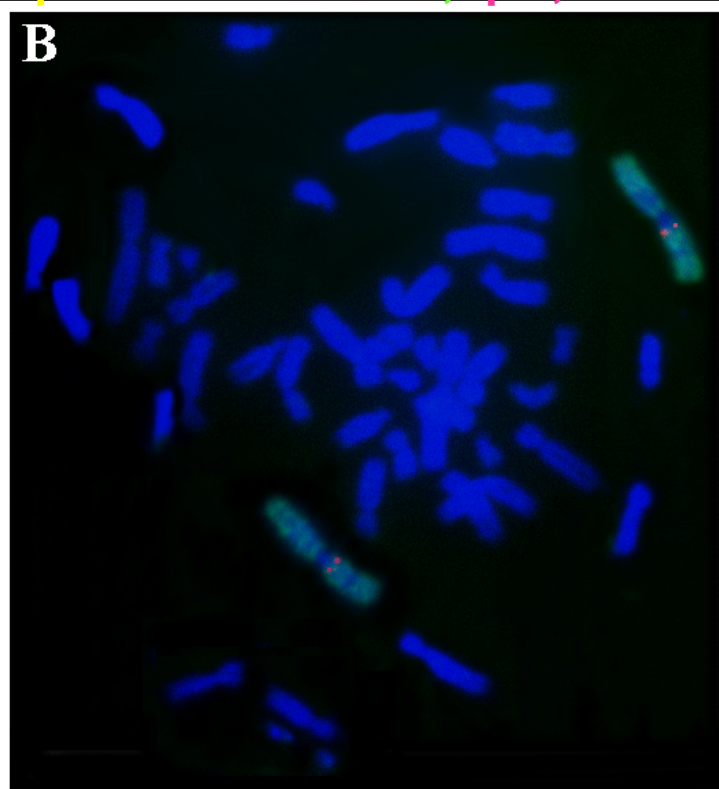
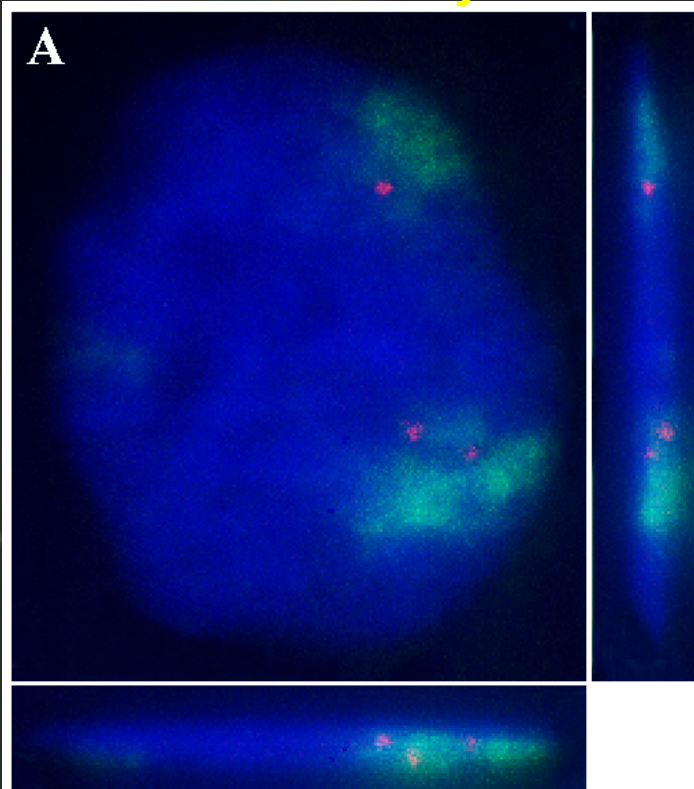
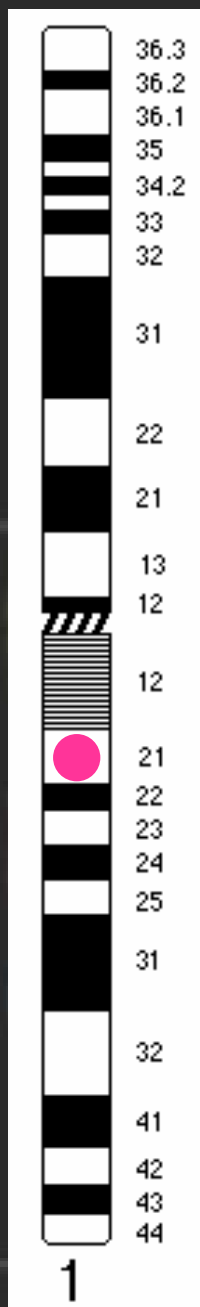
Cot-1 DNA (DNA lidské placenty)

- eliminuje repetitivní sekvence v DNA sondě (v lidském genomu jsou rozptýlené repetitivní sekvence (např. Alu-elementy))

- působí jako kompetitor vytvořené sondy –
→ zvýšení specifičnosti DNA hybridizace



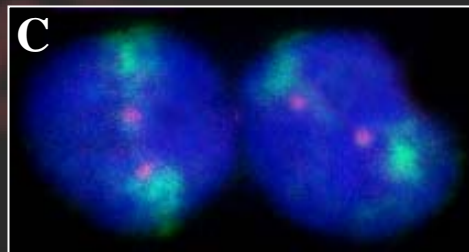
Ověření specifičnosti DNA sondy na lokus 1q21: chromozom 1, q21, DNA

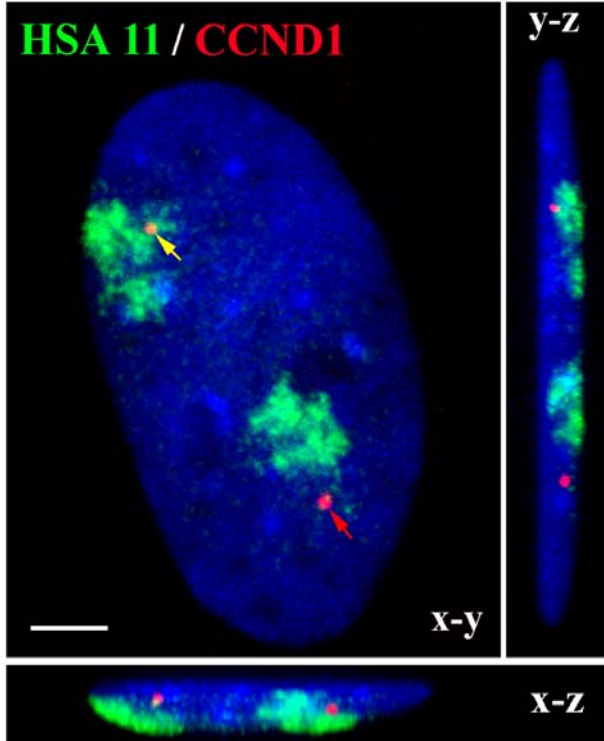
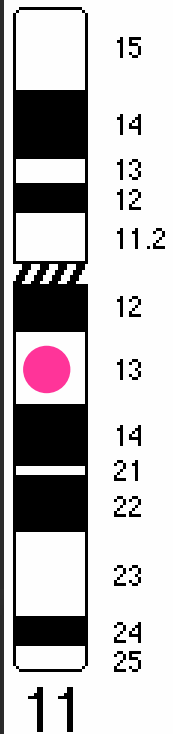


A) interfázní jádro buněčné linie HT29 (blízce triploidní)

B) metafázní chromozomy lymfocytu s normálním karyotypem

C) interfázní jádra CD138- buněk pacienta

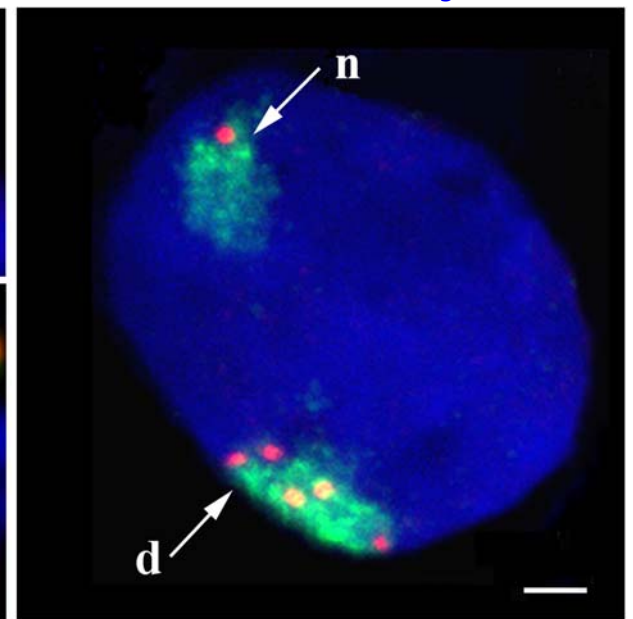
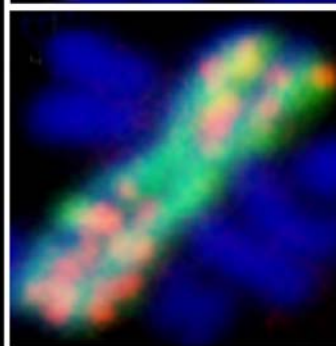
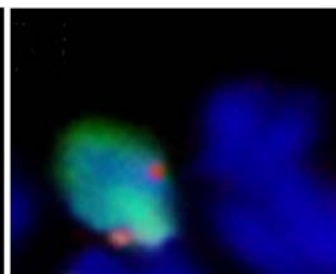
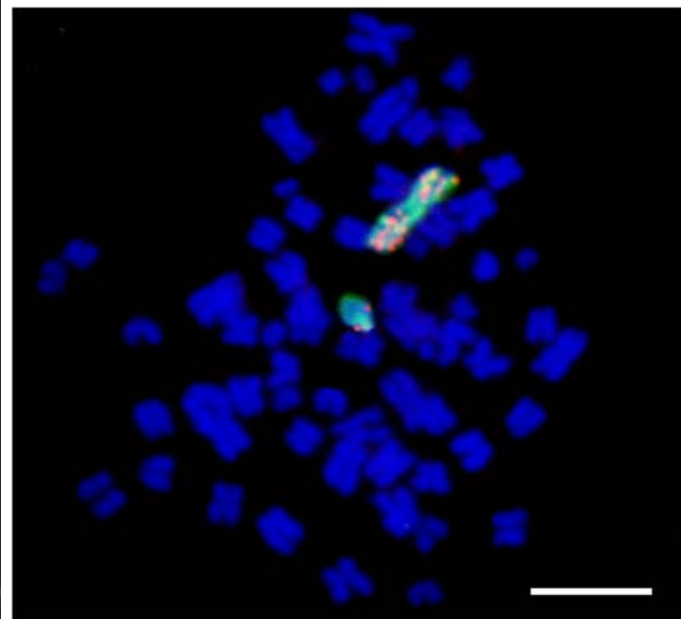
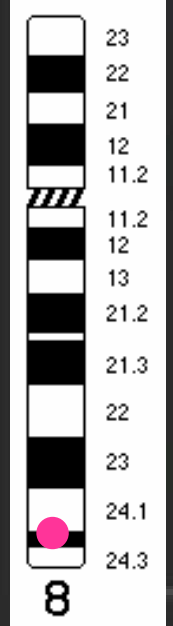




lidský fibroblast
interfázní jádro
chromosom 11
gen CCND1 (11q13)

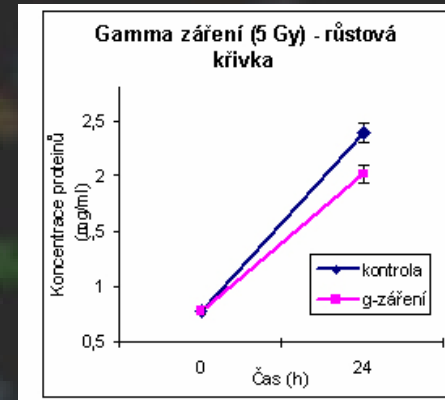
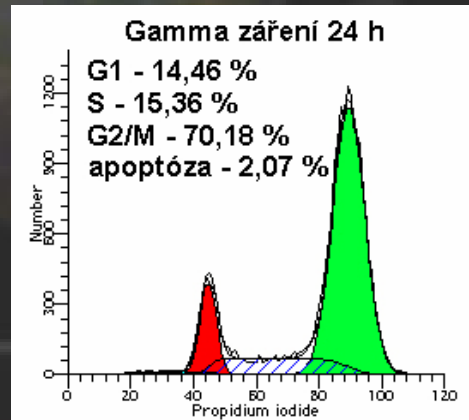
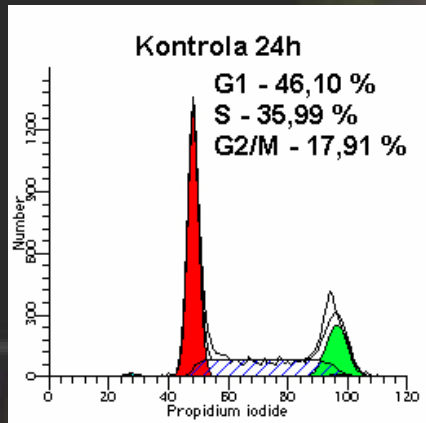
Galiová G.

Linie HT-29
teritorium chromosomu 8
gen c-myc (8q24)
na mitotickém chromosomu
nebo v interfázním jádře

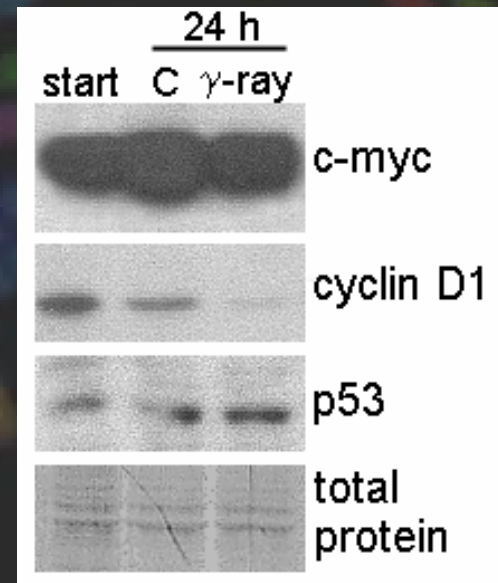
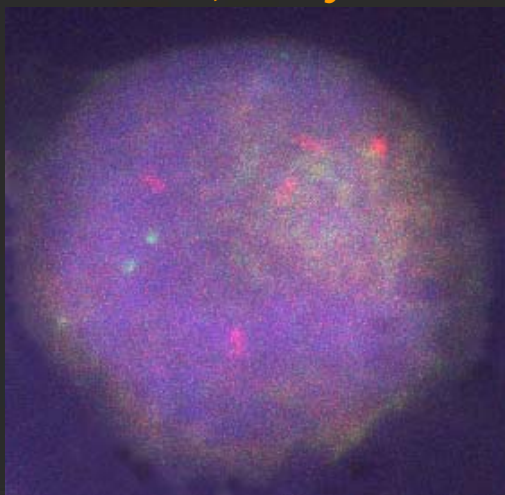
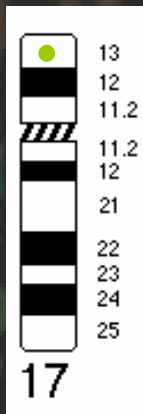


Harničarová A

Buněčná linie ARH 77 + pacienti MM



TP53, c-myc



Poděkování za spolupráci

Interní Hematoonkologická klinika FN Brno

Roman Hájek

Jana Smejkalová

Luděk Pour

Drahomíra Kyjovská

...a dalším

Laboratoř LEHABI

kolegové z BFÚ

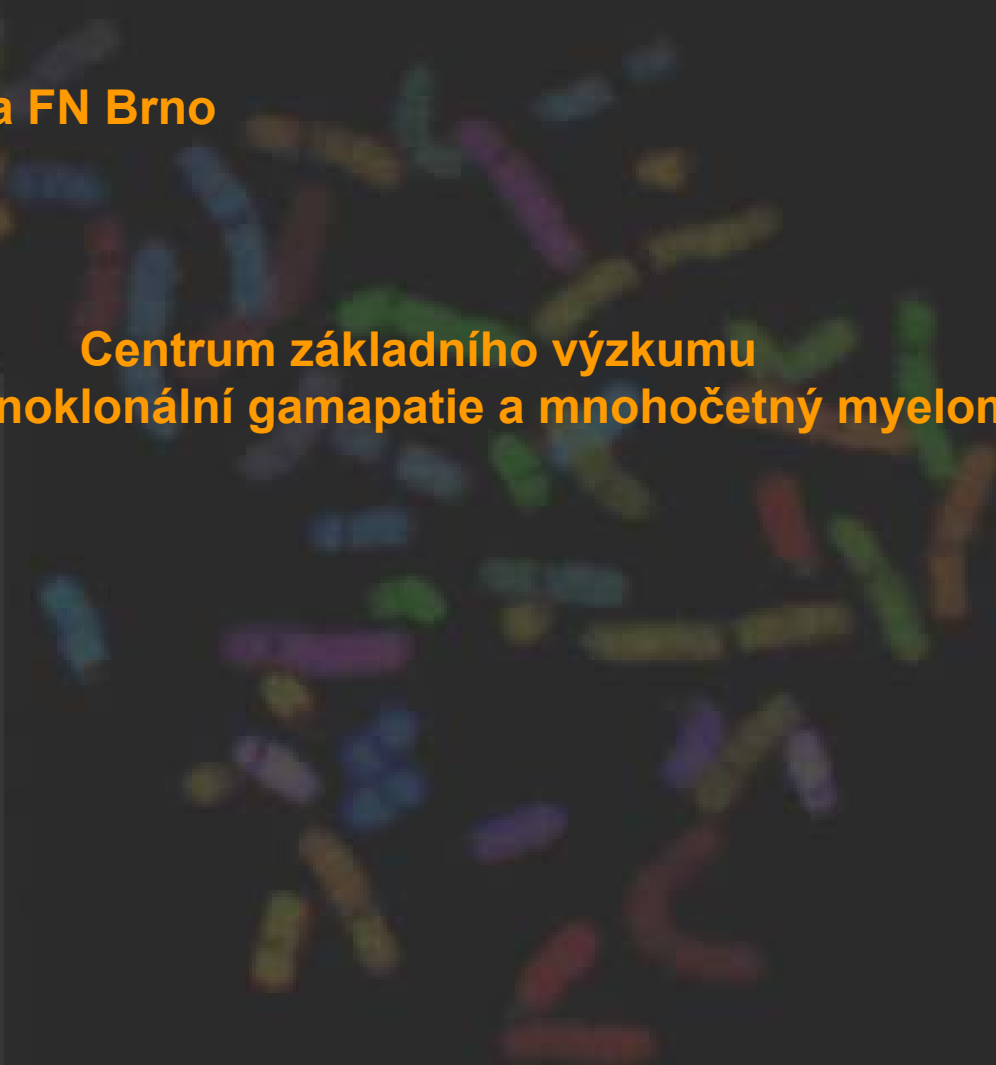
Stanislav Kozubek

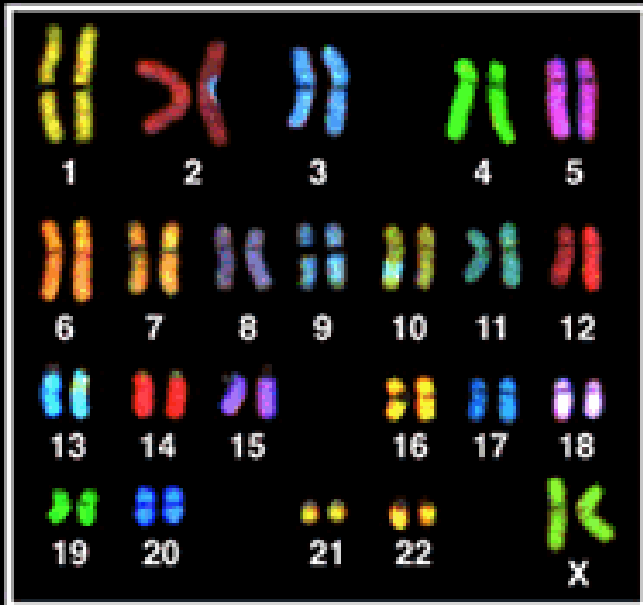
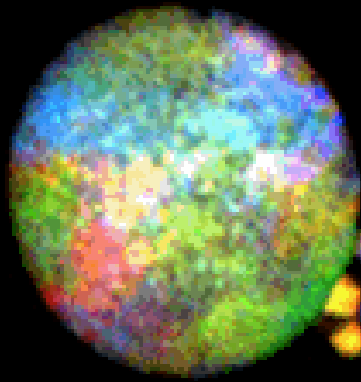
Eva Bártová

Andrea Harničarová

Centrum základního výzkumu

pro monoklonální gamopatie a mnohočetný myelom





... děkuji za pozornost.