

616-002.78:543.061

FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE. PRINCIP A METODA PŘEVEDENÍ

¹Npor. MUDr. Jan ÖSTERREICHER, ²plk. Dr.-med. Michael ABEND, ¹doc. MUDr. Pavel PETÝREK, CSc.
Katedra vojenské radiobiologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)

²Institut für Radiobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
(vedoucí: plk. prof. Dr.-med. Dirk van Beuningen)

Úvod

In situ hybridizace může být histologickým, cytologickým a jiným nástrojem pro detekci RNA nebo DNA buněčného původu. Základem této metody je vazba komplementárního pruhu (sondy) na cílovou nukleovou kyselinu. K vizualizaci této vazby lze použít fluorochrom nebo enzym (např. peroxidázu, která oxiduje 3,3'-diaminobenzidin a výsledný substrát se projeví hnědým zbarvením v místě přítomnosti enzymu). Pokud je pruh přímo konjugován s fluorochromem nebo enzymem, jedná se o přímou in situ hybridizaci. Pokud je vazba zprostředkována chemickou vazbou avidin-biotin (kdy je biotin předem konjugován na pruh a avidin je spojen buďto s fluorochromem, nebo enzymem) či digoxigenin-antidigoxigenin, mluvíme o in situ hybridizaci nepřímé.

V tomto článku popisujeme detekci centromery 17. chromozomu periferních lidských lymfocytů ve stadiu metafáze (1).

Materiál a metoda

Na předem vyčištěná sklíčka napíšeme diamantovou tužkou typ tkáně, typ pruhu aj. Pokud užíváme sklíčka s jedním nehladkým koncem, vpisujeme údaje běžnou grafitovou tužkou. Pro barvení buněk tkáňových kultur používáme následující postup.

Fixace

Buňky nanese na sklíčko a necháme je 30 minut fixovat (a permeabilizovat) v kyvetě obsahující 3 díly 99% metanolu a 1 díl 98% kyseliny octové při pokojové teplotě.

Příprava tkání

Dalším krokem je příprava buněk k hybridizaci spočívající v rozpuštění buněčné i jaderné membrány pomocí detergentu. Používáme 0,5% roztok Tritonu X-100 (firma Merck) v dvojnásobně koncentrovaném citrátovém pufru (2xSSC). V závislosti na typu tkáně a buněk používáme jiné ředění Tritonu X-100. Tento roztok necháme působit 30 minut v prostředí o teplotě 37 °C v termostatu, inkubátoru nebo vodní lázni. Citrátový pufr (2x SSC)

připravíme naředěním 20násobně koncentrovaného SSC (viz tab. 1).

Tabulka 1

20x SSC

Chlorid sodný	175,3 g
Citronan sodný	88,2 g
Deionizovaná voda	ad 800 ml
Pomocí 10 N NaOH vyrovnat pH na 7,0!	
Deionizovaná voda	ad 1000 ml

Roztok se sterilizuje v autoklávu a jeho trvanlivost je 1 měsíc při uchovávání v lednici při teplotě -4 °C.

Odvodnění

Po aplikaci detergentu je nutné buňky odvodnit ve vzestupné alkoholové řadě. Vzorky vkládáme postupně do etanolu o koncentraci 70 %, 80 % a 95 %. V každém roztoku ponecháme sklíčka 2 minuty. Poté sklíčka necháme schnout.

Denaturace tkáně

Nyní je nutné denaturovat dvoušroubovici DNA buňky, čímž dojde k cílené a specifické vazbě pruhu a DNA. Po odvodnění vložíme vzorky do roztoku složeného ze 7 dílů Formamidu (firma Merck) a 3 dílů 2x SSC. Kyveta s tímto roztokem se nachází ve vodní lázni o teplotě 70-74 °C (je nutné přesně dodržovat teplotní rozmezí). Při této teplotě necháme buňky inkubovat 2 minuty. K denaturaci bez přítomnosti Formamidu je potřebná teplota 100 °C. To by ovšem znamenalo ztrátu morfologické architektury tkání. Proto se používá kombinace Formamidu a vodní lázně o teplotě 70-74 °C. Elektrický potenciál cílové DNA i pruhu je negativní. Roztok 2x SSC se využívá ke snížení tohoto negativního potenciálu formou dodání sodíkových iontů DNA i pruhu. To zvyšuje pravděpodobnost bezproblémového navázání pruhu na cílový úsek DNA. Po denaturaci opět provádíme odvodnění použitím 3 kyvet s obsahem 70%, 80% a 95% etanolu. Vzorky necháme ponořené v každé kyvetě 2 minuty. Tentokrát však jsou kyvety vloženy do ledové tříště. Poté necháme vzorek vysušit.

Příprava pruhu

V tomto případě se jednalo o pruh specifický

proti centromere 17. chromozomu od firmy Oncor. Po vyjmutí průbu z lednice jej vložíme do vodní lázně o teplotě 37 °C na dobu 5 minut a to tak, aby byl spodek zkumavky s prábem omýván vodou. Tento postup je doporučován pro próby firmy Oncor. Poté prób napipetujeme v požadovaném množství (většinou 10 µl na 1 vyšetření) do mikrocentrifugační zkumavky o objemu 0,5 ml. Mikrocentrifugační zkumavku ponecháme 5 minut ve vodní lázni o teplotě 70-74 °C, přičemž je zkumavka zasazena do polystyrénové desky tak, aby byla spodní část zkumavky omývána vodou. Tímto postupem denaturujeme DNA průbu samotného. Následujícím krokem je 2-3 sekundy trvající centrifugace při pokojové teplotě.

Pak zkumavku vložíme do vodní lázně o teplotě 37 °C na dobu 5 minut až 2 hodin (než denaturujeme cílovou DNA na sklíčkách). Po vyjmutí z lázně je nezbytné opět centrifugovat 2-3 sekundy, než se přistoupí k hybridizaci samotné.

Hybridizace

Vlastní hybridizace, tj. navázání průbu na cílovou DNA, spočívá v inkubování průbu s buňkami. Ze zkumavky s prábem napipetujeme velmi pomalu (asi 10 s) 10 µl suspenze na 25x25 mm plochy krycího skla a opět velmi pomalu (stejnou rychlostí) nanášíme na sklíčko do centrální části výskytu buněk. Poté pomocí krycího sklíčka zakryjeme požadovanou plochu. Po přiložení krycího sklíčka provizorně celý preparát zamontujeme tekutou gumovou směsí (rubber cement), což zabrání vysušení mixtury.

Následně vložíme preparát do vlhké komůrky, komůrku i s preparáty do termostatu a při teplotě 37 °C je možné inkubovat preparát po dobu minimálně 30 min, v běžné praxi přes noc (asi 16 h), maximálně 3 dny. V mnichovském Institutu radiobiologie se používá i inkubace přes celý víkend, tj. od pátku do pondělí následujícího týdne.

Posthybridizační oplach

Po provedení inkubace buněk s prábem zbavíme sklíčka provizorní montáže sejmutím gumového povlaku pinzetou a sejmem krycí sklíčko tak, aby nedošlo k manuálnímu poškození buněk posuvem krycího sklíčka po podložním sklíčku. To lze provést buď potřeptáním ruky se sklíčkem, nebo ponořením preparátu do kyvety s 1x SSC při pokojové teplotě do té doby, než se krycí sklíčko odloučí. Dále se preparát vloží na dobu 5 minut do kyvety s obsahem 40 ml 1x SSC ve vodní lázni o teplotě 70-74 °C. Tento krok slouží ke zpevnění specifické, komplementární vazby průbu a cílové DNA a vymytí nespecifických vazeb prostřednictvím dodání malého množství sodíkových iontů. Menší množství sodíkových iontů u nespecifických vazeb způsobí menší pokles negativního elektrického potenciálu, což má za následek odloučení průbu v necílové oblasti a snížení v mikroskopu

pozorovaného pozadí. Pak sklíčka přeneseme na dobu 2 minut do roztoku 1x PBD (viz tab. 2) při pokojové teplotě.

1x PBD

Tabulka 2

Triton X - 100	1 g
PBS	ad 100 ml

Roztok je potřebné připravovat vždy čerstvý, maximálně však 1krát denně. V mnichovském Institutu radiobiologie se používá ředění 10x PBD (firma Oncor) se sterilizovanou destilovanou vodou 1:9 do 50 ml.

Dobarvení

K dobarvení byl použit etyidium bromid o koncentraci 10 mg/ml (firma Sigma) a upravený ředěním 1:5000 až 1:10 000. Tato procedura je vhodná pouze pro pozorování v laserovém skenovacím mikroskopu s argon-kryptonovým laserem. Pro pozorování preparátu v konvenčním fluorescenčním mikroskopu se doporučuje dobarvení pomocí DAPI (4,6-Diamidine-2-phenylindol-Dihydrochloride, firma Sigma) naředěného deionizovanou vodou v poměru 1:100. Při montování krycího skla bylo použito Antifade (viz tab. 3), který zabraňuje poklesu intenzity signálu fluorochromu u zamontovaných preparátů (při uchovávání v lednici o teplotě -20 °C) na dobu několika dnů až týdnů v závislosti na intenzitě signálu. U nezamontovaných preparátů je možné, při stejném způsobu skladování preparátu, zachovat měřitelný signál po dobu několika týdnů až několika měsíců.

Antifade

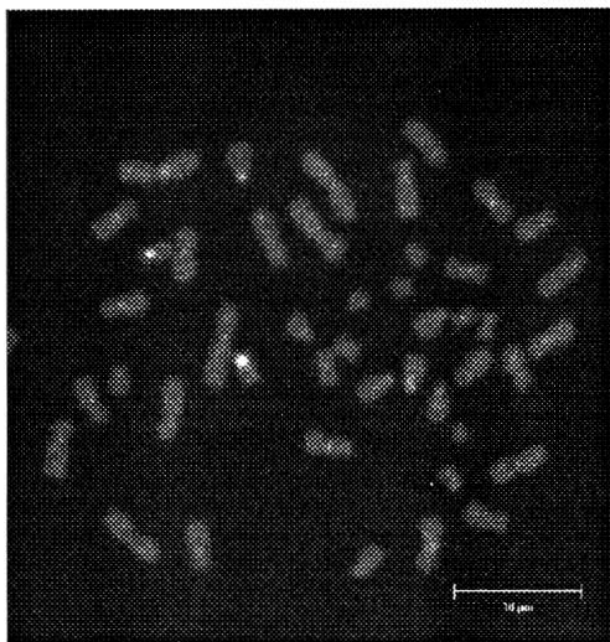
Tabulka 3

p-Phenylendiamin 97%	10 mg
PBS	1 ml
Glycerol	9 ml
Pomocí 10 N NaOH vyrovnat pH na 8 až 9!	

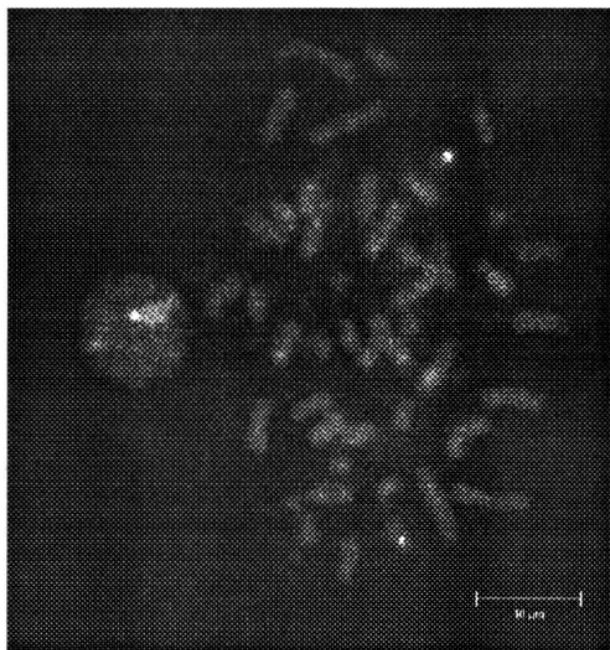
Výsledný roztok rozdělíme do mikrocentrifugačních zkumavek po 0,3-0,5 ml. Antifade je fotosenzitivní sloučenina, proto je nezbytné jej uchovávat v temnu, např. zkumavky obalit hliníkovou fólií. Zkumavky se uchovávají v mraznici při teplotě cca -20 °C.

Výsledky

Výsledkem barvení je světlezeleně fluoreskující (pomocí FITC) cílový úsek DNA, v tomto případě centromery 17. chromozomu. Ostatní chromatin se projevuje tmavě červenou barvou, v tomto případě použitím ethidium bromidu.



Obr. 1 Na tomto obrázku můžeme pozorovat lidský periferní lymfocyt ve stadiu metafáze s detekcí centromer 17. chromozomu. Barvení - FITC, dobarvení - ethidium bromid. Měřítka udává vzdálenost 10 μm .



Obr. 2 Tento obrázek zachycuje dva periferní lidské lymfocyty, jeden ve stadiu metafáze (vpravo) a druhý v interfázi. U obou byly detekovány centromery 17. chromozomu vizualizované použitím FITC. Dobarvení - ethidium bromid. Měřítka udává vzdálenost 10 μm .

Diskuse

In situ hybridizace je v posledních letech již rutinním nástrojem molekulární biologie. Pokud je používána metoda in situ hybridizace, je vždy nutné si ověřit správnost barvení na buňkách ve stadiu metafáze. V praxi, chceme-li kvantitativně a kvalitativně posuzovat výsledný signál histologických či cytologických preparátů, je nezbytné mít konvenční fluorescenční mikroskop propojený s počítačem prostřednictvím černobílé kamery. Počítač dále musí obsahovat software počítačové analýzy obrazu, s jejíž pomocí můžeme přesně měřit intenzitu výsledného signálu. Tímto způsobem lze například měřit expresi proteinu na úrovni mRNA.

V radiobiologickém výzkumu lze touto metodou získat údaje o expresi jednotlivých členů cytokinové kaskády (jak proinflatorních, tak profibrotických), která se spouští po expozici ionizujícím zářením. Také lze stanovit míru účinnosti terapeutických zásahů, například na úrovni mRNA.

S pomocí in situ hybridizace můžeme také definovat míru poškození genetické výbavy (genomu) ozařovaných tkání buďto celých chromozomů, nebo jen samotných genů. I zde by bylo možné stanovit míru protektivních zásahů, intenzitu reparace aj.

Souhrn

Práce uvádí základní postup detekce DNA použitím metody in situ hybridizace na příkladu barvení centromer 17. chromozomu lidských lymfocytů ve stadiu metafáze. Autoři popisují nejen detailní pracovní postup, ale poskytují i vysvětlení opodstatněnosti zvolených postupů.

Poděkování

Autoři děkují panu Richardu Obermairovi za pomoc při praktické výuce této metody. Zvláštní poděkování patří vedení Sanitätsakademie der Bundeswehr v Mnichově a vedení Vojenské lékařské akademie v Hradci Králové za umožnění studijní stáže dr. J. Osterreicherovi.

Literatura

1. Sagner, G.: Identification of chromosomes in metaphase spreads with DIG- or fluorescein-labeled human chromosome-specific satellite DNA probes. In: Nonradioactive In Situ Hybridization. Application Manual. 2nd ed. Boehringer Mannheim, 199X, 88-93.

Klíčová slova: In situ hybridizace; Metoda; Principy.

Do redakce došlo 7. 9. 1998