به نام خداوند بخشنده مهربان

ژنتیکا

روشها و پروتکلهای ژنتیکی

www.genetica.ir

FISH
مروری بر روش هیبریداسیون فلوئورسانس درجا

شاهین اسعدی دانشجوی ژنتیک مولکولی – دکتر مهدی قیامی راد
(میکروبیولوژیست) استادیار دانشگاه

۱- چشم انداز و تاریخچه هیبریداسیون درجا[1]

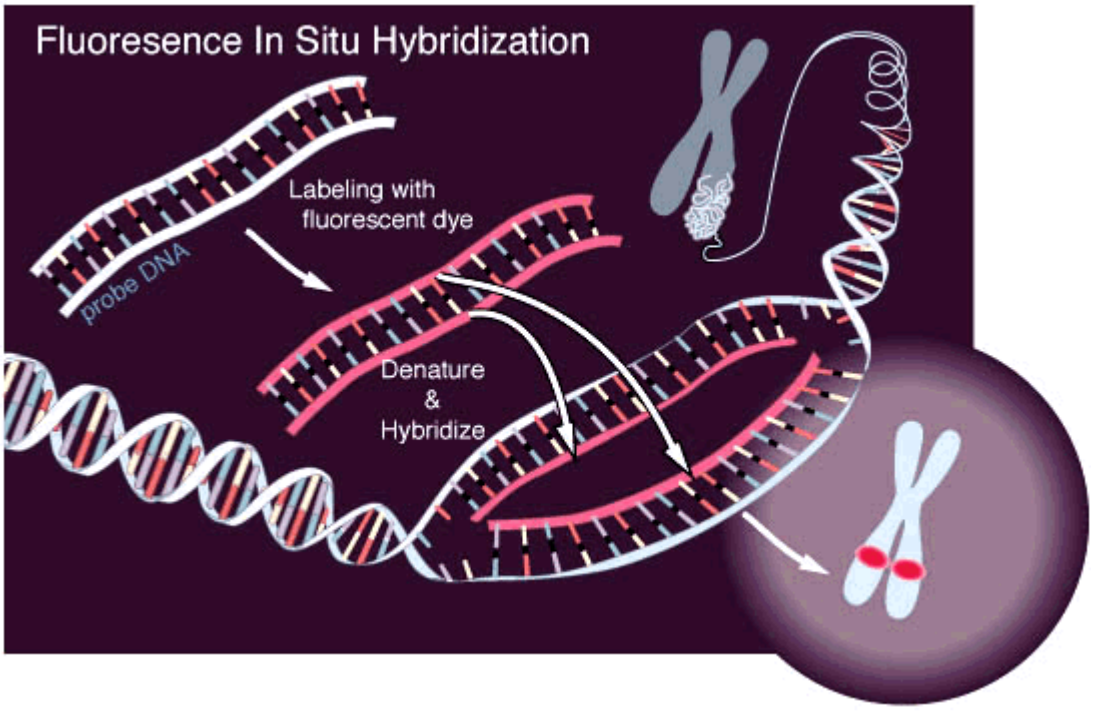
پس از اثبات اینکه تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیک انسانی ۴۶ عدد می‌باشد (Levan و Tjio، ۱۹۵۶ و Ford و همکارانش، ۱۹۵۶) و نیز کشف ارتباط تریزومی ۲۱ با سندرم داون (Lejeune و همکارانش، ۱۹۵۹)، روش‌های تشخیص سیتوژنتیک در کارهای بالینی روزمره وارد شد. پیشرفت بعدی سیتوژنتیک پس از بوجود آمدن روش‌های باندینگ کروموزومی بود (Casperson و همکاران، ۱۹۶۸) که تعیین یکایک کروموزوم‌های انسانی را میسر ساخت و به این صورت کوچک‌ترین انحرافات کروموزومی را معین نمود. دقت تجزیه و تحلیل سیتوژنتیک بطور عمده به گسترش پرومتافازی و باندینگ وابسته است که میزان آن ۲-۵Mb است و می‌تواند ناهنجاری‌های کوچک کروموزومی مثل del (۱۳q۱۳) در سندرم رتینوبلاستوما و del (۱۵q۱۳) برای سندرم Prader-Willi را مشخص کند.

اولین گزارش در مورد روش هیبریداسیون توسط Mamur و Lane در سال ۱۹۶۱ صورت گرفت و آنها نشان دادند که ملکول‌های DNA می‌توانند تحت شرایط کنترل شده‌ای از هم گسیخته شوند و سپس به یکدیگر متصل گردند. به علت اینکه پیوندهای هیدروژنی ضعیف‌تر از باندهای کوالان موجود در ساختمان DNA هستند، در اثر حرارت دو رشته DNA از یکدیگر گسسته می‌شود، بدون اینکه بازها از ستون اصلی یا Back bone قند– فسفات جدا شود؛ وقتی دوباره شرایط به حـــــالت عادی مثل دمای کمتر از دمای ذوب[2] برگردد، رشته‌های موجود دوباره به همدیگر می‌پیوندند. از هم بازشدگی دو رشته یا واسرشت شدن[3] و دوباره پیوند شدن[4] دو رشته DNA بستگی به میزان GCهای DNA و نیز PH محیط دارد. چنانکه در مرحله دوباره پیوند شدن فقط دو رشته مکمل DNA وجود داشته باشد، پیوند شدن بطور کامل صورت می‌گیرد اما چنـــانکه ترادفی از اسیدهای نوکلئیک

---

[1]. ***In Situ* Hybridization (ISH)**
[2] .**Melting temperature**
[3] .**Denaturation**
[4] .**Reassociation**

-که بنام پروب Probe یا نشانگر مطرح است- حضور داشته باشد، می‌تواند به قسمت خاصی از ملکول اصلی DNA که مکمل آن است هیبرید شود. (شکل ۱-۱)



شکل ۱-۱: نقش پروب در شناساندن جایگاه خاص روی ژنوم

در سال ۱۹۶۹ Gall، Paradue و نیز John و همکارانش، روش هیبریداسیون درجا ایزوتوپیک[1] را ابداع کردند. این روش که اغلب روش مستقیمی جهت مطالعه محل قرارگیری توالی‌های DNA روی کروموزوم بود به عنوان یک روش روزمره در جهت تعیین نقشه ژنی، در بسیاری از آزمایشگاه‌ها در دهه ۱۹۷۰ میلادی مطرح بود.

اولین بار در سال 1981، Gerhard و همکارانش و نیز Malcolm و همکارانش و همچنین Harper و همکارانش امکان جایگزینی توالی‌های تک کپی از ژن‌های منفرد را توسط روش هیبریداسیون درجا ایزوتوپیک نشان دادند.

با پیشرفت‌های ایجاد شده در دهه ۱۹۸۰ توسط Rapp و همکارانش ۱۹۹۰ هیبریداسیون درجا غیر رادیواکتیو جهت حل برخی از محدودیت‌های مواد رادیواکتیو معرفی شد. در این

[1] **Isotopic *In Situ* Hybridization**.

روش، پروب ایزوتوپیک نشاندار شده، با هاپتن‌های غیر رادیواکتیوی که توسط روش‌های ایمنولوژیکی و با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی هاپتن شناسایی می‌شد، جایگزین گردید. آنتی‌بادی‌ها با آنزیم‌ها و رنگ‌های فلورسانت[1] (Fluorescent dyes) واکنش نشان می‌دادند.
هیبریداسیون فلورسانس درجا[2] (FISH) ابتدا توسط Landegent و همکارانش (۱۹۸۴) معرفی شد و طی چند سال بطور فزاینده‌ای رشد کرد. دلایل متعدد این پیشرفت، سرعت قابل توجه، بهبود میزان دقت سیگنال و پیشرفت ابزارهای اپتیکی برای تجزیه و تحلیل‌های دو بعدی و سه بعدی از نمونه‌های نشاندار شده است. FISH امروزه انقلابی در ژنتیک انسانی ایجاد نموده است و در علوم پایه، سرعت مطالعات ژنومی را بطور بسیار محسوس بالا برده است و در تهیه نقشه ژنی، نقش حائز اهمیتی دارد. از نظر تشخیصی، FISH باعث تعیین و شناسایی آنومالی‌های پاتولوژیکی کروموزومی درسرطان شناسی (Nederlof و همکاران ۱۹۸۹، Arnoldus و همکاران ۱۹۹۰ و Smith و همکاران ۱۹۹۱) و همچنین ناهنجاری‌های مادرزادی (Kuwane و همکاران ۱۹۹۱) و انحرافات تک ژنی (Ried و همکاران ۱۹۹۰) می‌شود.
هیبریداسیون درجای فلورسانس با بهره‌گیری از پروب‌های اختصاصی کروموزومی می‌تواند تعداد نسخه‌های کروموزوم‌های معینی را در هسته‌های اینترفازی مشخص کند.(Lichter و همکاران، ۱۹۸۸ و Pinkel و همکاران، ۱۹۸۸) و این روش اصطلاحاً بنام سیتوژنتیک اینترفازی نامیده می‌شود. مهم‌ترین مزیت این روش، عدم نیاز به کشت سلولی و در نتیجه حصول نتیجه در عرض دو روز است. این روش، دارای کاربردهای مهمی برای تجزیه و تحلیل آنوپلوئیدی موجود در کروموزوم‌های جنین با استفاده از سلول‌های مایع آمنیوتیک کشت نشده است.
امروزه پتانسیل روش FISH توسط تشخیص همزمان پروب‌های چندگانه که هر کدام با هاپتن جداگانه‌ای نشاندار می‌شوند، افزایش می‌یابد. تعداد ترادف‌هایی که بطور همزمان می‌تواند در یک آزمایش هیبریداسیون ساده شناسایی گردد، می‌تواند بوسیله نسبت نشاندار کردن، افزایش یابد. سیستم‌های دیجیتالی تصویری، مثل دوربین CCD با قابلیت‌های پردازش تصویر عالی، میزان حساسیت تشخیص و پتانسیل FISH چند رنگی را در سیتوژنتیک بالینی بهبود می‌بخشد.

---

[1] **Fluorescent dyes**

[2] **Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

۲-۱- مبانی مقدماتی هیبریداسیون فلوئورسانس درجا:

هیبریداسیون درجا (ISH) عبارتی است که جهت توضیح هیبریداسیون کروموزوم‌ها و کروماتین در طی سیکل سلولی توسط پروب‌های نشاندار شده اسیدهای نوکلئیک بکار می‌رود. روند روش بدین گونه است که وقتی DNAی دو رشته‌ای حرارت می‌بینند، رشته‌ها از هم باز می‌شوند. اگر دما کاهش یابد، رشته‌ها مجدداً به همدیگر متصل شده و اصطلاحاً Anneal می‌شوند (شکل ۲-۱ و ۳-۱). حساسیت ISH وابسته به متغیرهای ذیل است:

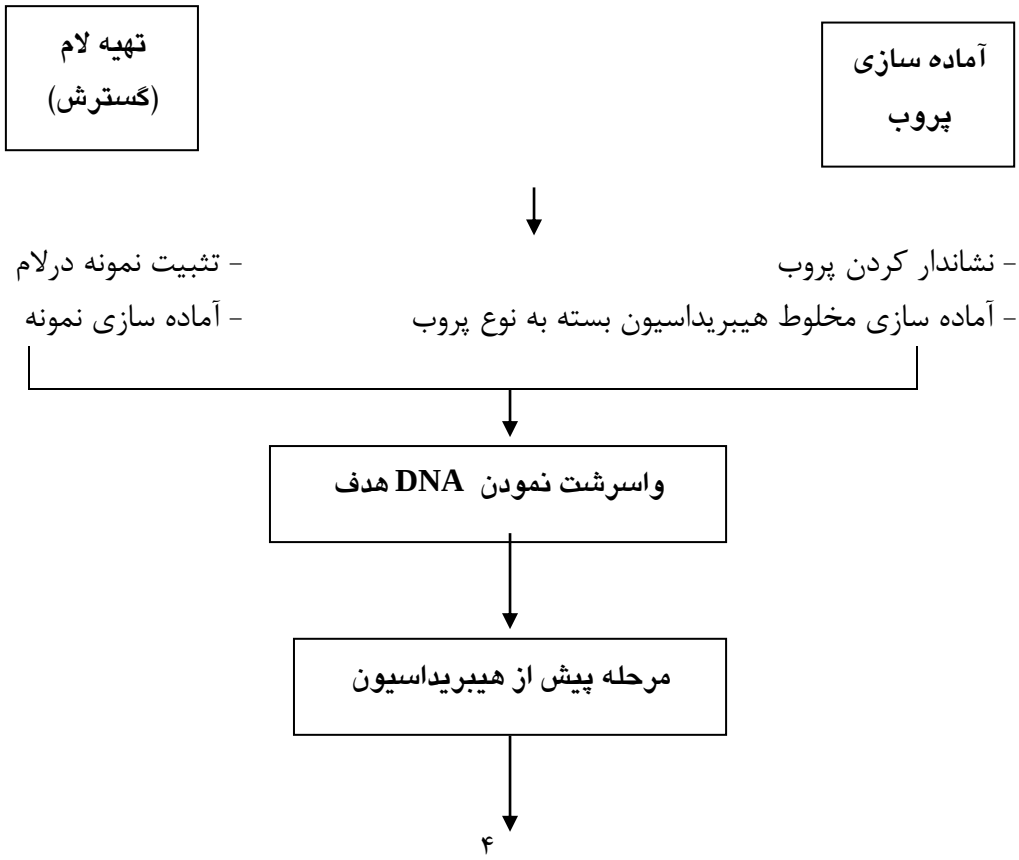
الف- کیفیت بافت مورد نظر و ملکول هدف برای هیبریداسیون (اعم از DNA یا RNA)

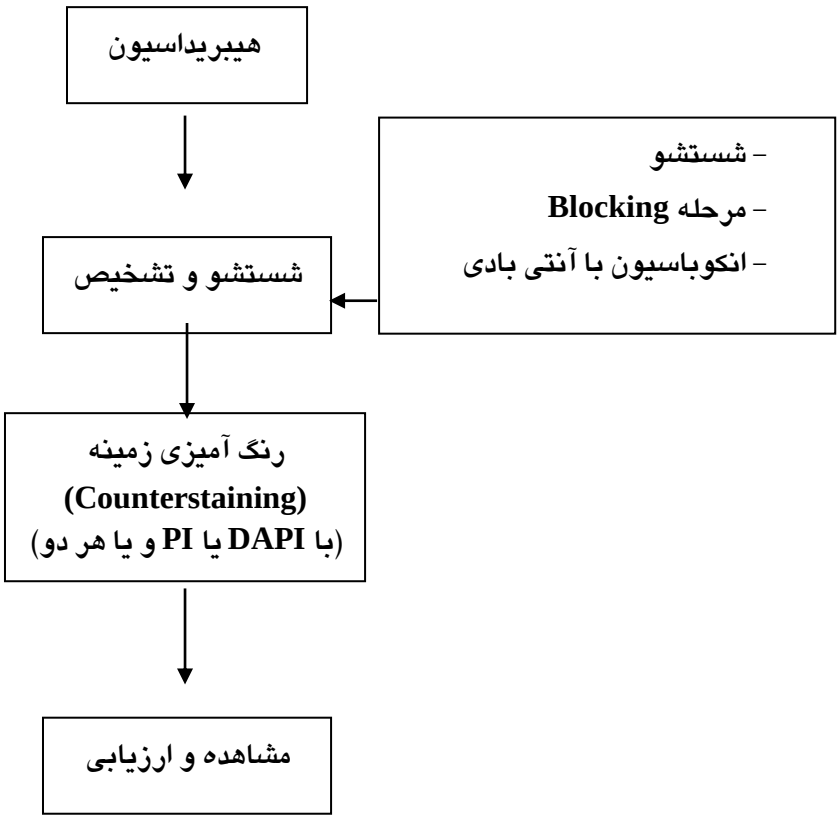
ب- نوع پروب بکار رفته و خاصیت پروب نشاندار شده و حساسیت روش بکار رفته جهت تشخیص سیگنال

ج- اثر شرایط هیبریداسیون

د- حساسیت و میزان دقت روش‌های مشاهده

شکل ۲-۱: نمایش شماتیک مراحل انجام FISH بر روی گسترش‌های اینترفاز و متافاز





۳-۱- تهیه نمونه:

روش FISH می‌تواند برای تشخیص اختلالات کروموزومی بر روی انواع مختلفی از نمونه‌ها؛ از سلول‌های اینترفازی و متافازی حاصل از کشت سلول‌های خون محیطی گرفته تا سلول‌های آمنیوسیت جنینی کشت داده نشده و تومورهای توپر مورد استفاده قرار گیرد.

اغلب نمونه‌های مورد نیاز برای FISH نمونه‌هایی هستند که روی لام‌های میکروسکوپی قرار دارند، اما نمونه‌های سلولی موجود در سوسپانسیون نیز بطور موفقیت آمیزی توسط برخی از محققین (Trask و همکاران در ۱۹۸۸) برای FISH استفاده گردیده‌اند.

سلول‌های کشت داده شده یا نمونه‌هایی که برای تهیه سلول‌های اینترفازی مورد استفاده قرار می‌گیرند، ابتدا با محلول هیپوتونیک آماده می‌شوند. این آماده سازی، سلول‌ها را متورم می‌کند و کروموزوم‌ها را جهت فیکس کردن از هم جدا کرده و آماده می‌سازد. غلظت پائینی از محلول هیپوتونیک می‌تواند سلول‌های اینترفازی را بخوبی متورم کند و این کار جهت مشاهده سیگنال‌های چند رنگی بسیار حائز اهمیت است، زیرا فضای کافی برای مشاهده هدف‌های مورد نظر در سلول‌های کشت داده نشده اینترفازی مورد نیاز است. سلول‌های بدست آمده بایستی پس از قرار گرفتن در محلول هیپوتونیک، مراحل فیکس کردن را بگذرانند. ثبوت یا

فیکساسیون باعث می‌شود مورفولوژی بافت به حالت طبیعی باقی مانده و حداقل میزان اسیدهای نوکلئیک از دست برود.

مورفولوژی و نفوذپذیری نمونه‌ها، نقش مهمی در آزمایش‌های هیبریداسیون درجا دارند. یک رابطه ملکولی بین میزان ثابت نمودن و نفوذپذیری بافت وجود دارد. فیکس کردن زیاد نمونه‌ها ممکن است شکل کروموزوم‌ها یا سلول‌ها را به خوبی حفظ کند، اما دسترسی پروب و مواد تشخیصی را کاهش می‌دهد. متانول و اسیداستیک (به نسبت ۱:۳) کاربرد وسیع‌تری نسبت به سایر فیکساتیوهای دیگر مثل گلوتارآلدئید یا فرمالدئید در روش FISH دارند، زیـــــرا آنها نفوذ پذیری بافت را بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش نمی‌دهند (Leith و همکاران در سال ۱۹۹۴)، نمونه‌ها روی لام‌های آزمایشگاهی از نوع نمونه‌های متافازی یا اینترفازی فیکس می‌شوند. این لام‌ها بایستی کاملاً عاری از هر گونه چربی یا لک باشند زیرا در آن صورت کروموزوم‌ها یا هسته‌های آماده شده، نمی‌توانند به خوبی روی لام‌ها بچسبند و در طی روند هیبریداسیون In Situ کنده شده و گم می‌شوند. لام‌ها همچنین ممکن است با یک ماده چسبنده‌ای پوشانده شود تا میزان چسبندگی مواد فیکس شده را افزایش دهد، این مرحله زمانی بسیار حائز اهمیت است که اندازه نمونه، محدود بوده و با این کار در هنگام شستشو و مراحل تشخیص، مانع از جدا شدن نمونه شود. ماده ۳–Aminopropyl-triethoxysilane (APES) به عنوان یک ماده چسبنده، باعث بهبود کیفیت سلول‌ها و بافت می‌شود.

جهت از بین بردن RNAی سیتوپلاسمی و RNAی هسته‌ای از Rnase-A استفاده می‌شود و این عمل باعث جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی ایجاد شده با پروب می‌شود. استفاده از آنزیم جهت از بین بردن پروتئین‌ها (مثل پروتئیناز K) نیز می‌تواند دسترسی پروب‌ها و مواد تشخیص را آسان‌تر نماید. اگر نفوذ مواد مشکل باشد، میزان غلظت آنزیم می‌تواند افزایش یابد، اما اگر مورفولوژی سلول یا کروموزوم پایین باشد بایستی میزان غلظت کاهش یابد.

استفاده از پاک کننده‌ها جهت پاک کردن سطح غشاء لیپیدی در اطراف DNAی هدف است. پروتئاز نیز جهت افزایش دسترسی پروب به DNA توسط تجزیه پروتئین‌هایی که در اطراف اسیدهای نوکلئیک هدف می‌باشد، مفید بوده، اما موفقیت استفاده از پروتئاز در نمونه‌های متافازی کم است، زیرا آنها به کروموزوم‌ها چسبیده و مورفولوژی هسته‌ها را تغییر می‌دهند. گزیلن و استون نیز جهت پاک کردن برخی از اجرام زاید دیگر بکار می‌رود.

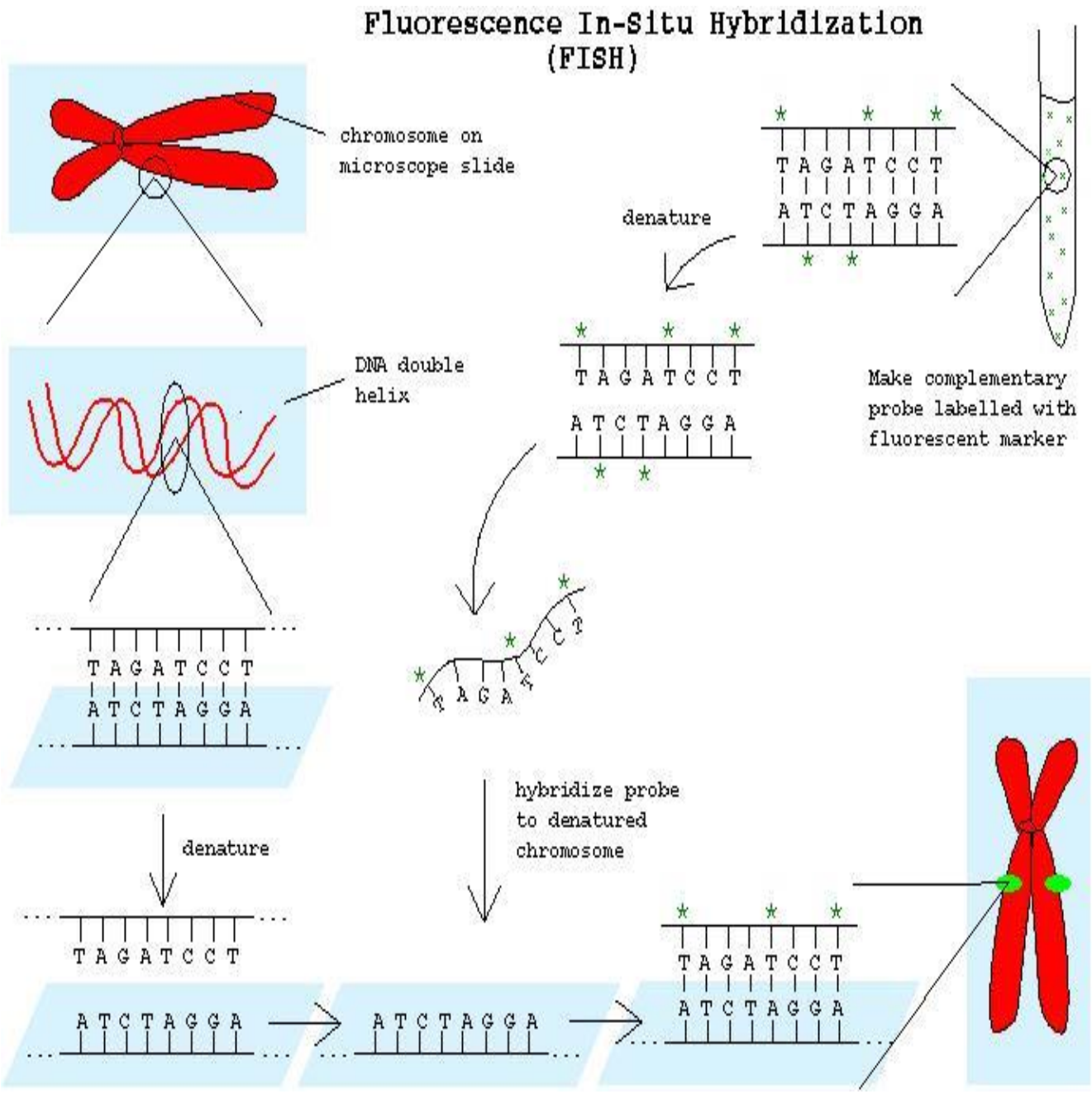


Figure 1-3: Schematic

4-۱- پروب‌ها (Probes):

پروب یک قطعه اختصاصی برای هیبریداسیون In Situ است. خالص بودن، اندازه و نیز میزان اختصاصی بودن یک پروب نقش اساسی در تعیین سیگنال‌های بوجود آمده در روش هیبریداسیون درجا دارد.

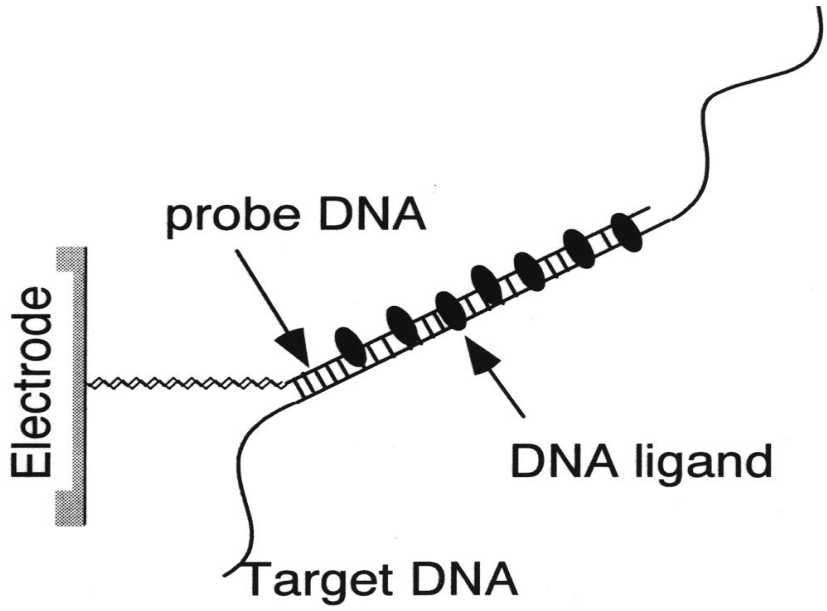
ترادف‌های DNA معمولاً با استفاده از پروب‌های DNA مشخص می‌شوند، در حالی که برای تشخیص RNA می‌توان از پروب‌های DNA یا RNA استفاده کرد، بهترین طول برای پروب‌های هیبریداسیون درجا حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ bp است. پروب‌های کوتاه‌تر دارای ثبات پائین‌تر در هیبریداسیون و پروب‌های طویل‌تر (خصوصاً بیش از ۱Kb) ممکن است مشکلات نفوذ در بافت داشته باشند.

در عمل، تکنولوژی نوترکیبی DNA قادر به کلونینگ و تخلیص ترادف DNA است

پروب‌های با طول کوتاه معمولاً بطور شیمیایی ساخته می‌شوند، اما اغلب پروب‌ها، قطعات کلون شده DNAی طبیعی هستند. تکنولوژی DNA نوترکیب امروزه دسترسی به قطعات DNA مورد نظر برای تحقیقات ملکولی را آسان کرده است. قطعات DNA بعد از کلون شدن در سیستم‌های میکروبی به مدت چندین سال در دمای ۷۰°C- و در گلیسرول ۲۰-۱۵٪ می‌توانند نگهداری شوند.

سلول‌های میزبان واجد DNAی پروب را می‌توان در محیط کشت مناسب کشت داد و سپس DNAی استخراج شده را بعد از نشاندار کردن به عنوان پروب مورد استفاده قرار داد.

از هر ۸۰ میلی‌لیتر سلول میزبان کشت داده شده حدود ۲۰۰-۱۰۰ میکروگرم DNAی پروب (بسته به نوع و اندازه ناقل) حاصل می‌شود. البته کیت‌های جداسازی DNA امروزه، بطور آماده جهت جدا کردن DNAی پلاسمید و کاسمید قابل دسترسی هستند.



5-۱- تشخیص همزمان ترادف‌های چندگانه:

شناسایی چندین رنگ از پروب‌های نشاندار شده متفاوت، نیاز به ترکیب دو یا چند سیستم تشخیصی جهت استفاده در یک منطقه هیبریداسیون واحد دارد. این روش بر این نظر متکی است که هر هاپتنی می‌تواند به یک آنتی‌بادی اختصاصی متصل شود و با یک نوع رنگ فلورسنت شناسایی گردد. در آزمایش FISH دو رنگی، مخلوط‌های تشخیصی حاوی آنتی‌بادی‌هایی اختصاصی برای هر ماده نشاندار کننده (Label) است که بطور مختلفی با رنگ‌های فلوروکروم متصل می‌شوند. وقتی سه مورد از فلوروفورهای قابل شناسایی موجود هستند ترادف‌های مجزای DNAی کروموزومی می‌تواند بطور همزمان توسط ترکیب فلوروفورهای اختصاصی با سه پروب نشاندار شده مختلف شناسایی گردد (Nederlof و همکاران ۱۹۸۹).

تعداد ترادف‌هایی که می‌تواند بطور همزمان در یک آزمایش شناسایی شود توسط تشخیص پروب‌های مخلوط شده نسبی و نشاندار شده نسبی، با یک سیستم تشخیصی دوگانه و یا چندگانه افزایش می‌یابد. در این روش ترادف‌ها با پروب‌های یاد شده تولید علائم (سیگنال) با رنگ‌های حد واسط، رنگ‌های اصلی ایجاد می‌کنند. با استفاده از سه سیستم تشخیصی و نشاندار شده، تعداد سیگنال‌های قابل شناسایی بطور همزمان می‌تواند سیر صعودی داشته باشد.

در تحلیل روش FISH چند رنگی، برای تمام ۲۲ جفت کروموزوم سوماتیک و کروموزوم‌های جنسی توأماً ۲۴ پروب رنگی کامل بکار رفته که از طریق طیفی قابل تشخیص هستند.

بوسیله FISH تک‌رنگی جابجایی‌های مبهم و پیچیده بین دو قطعه و نوعی جابجایی نادر insertion و نشانگرهای یک منبع نامشخص فوراً تشخیص داده می‌شود.

در FISH دو رنگی، دو پروب که به طور متفاوت رنگ‌آمیزی و نشاندار شده‌اند (مثلاً با بیوتین یا دیگوگزی ژنین) با غلظت‌های درست و مناسب در هم آمیخته می‌شوند تا توأماً به عنوان DNA پروب یک FISH به کار روند.

مشاهده همزمان بیش از ۲ هدف ممکن است با آمیختن بیش از یک نشان در مقداری پروب، با نسبت‌های متفاوت و پیوند پروب نشاندار شده به طور متفاوت با هدف‌های ویژه محقق شود.

کاریوتایپینگ طیفی و شناسایی فوری هر یک از کروموزوم‌ها در مرحله متافاز امروزه از معمول‌ترین کاربردهای FISH چند رنگی می‌باشد.

در این روش‌ها ۲۴ پروب کروموزومی رنگی و ۵ فلوروکروم در یک طرح نشاندار ترکیبی بکار می‌رود. (یعنی برای اجرای طرح، نشاندار نمودن ۲۴ پروب کروموزومی از ۵ رنگ فلورسنتی

استفاده می‌شود) که هر یک از ۲۲ کروموزوم اتوزومی و x و y را به طور متفاوت نشاندار می‌کند.

۶-۱- رنگ‌آمیزی زمینه و مشاهده (Counterstaining & Visualization):

به دنبال مراحل تشخیص، نمونه‌ها باید برای مشاهده با سیستم‌های مناسب آماده گردند. در روش‌هایی که آنزیم در آنها نقش دارد، اسلایدها با یک معرف رنگی روشاول پوشانده شده و توسط میکروسکوپ نوری مشاهده می‌گردند، اما سلول‌هایی که با آنتی‌بادی‌های متصل شونده به فلوروسنت شناسایی می‌گردند با یک ماده رنگ کننده زمینه‌ای مناسب باید رنگ‌آمیزی شوند.

استفاده از ماده رنگ کننده زمینه‌ای، مشاهده آسان گستره‌های متافازی و هسته‌های اینترفازی را تسهیل می‌بخشد. DAPI (۴ و ۶ – دی آمینو – ۲ – فنیل ایندول) یک رنگ زمینه‌ای آبی است که می‌تواند به همراه رنگ‌های فلوروسانت سبز (FITC) و قرمز (Rhodamin و یا Texas Red) بکار رود.

Propidium Iodied (قرمز) یک رنگ زمینه‌ای دیگر است که بطور مجزا مورد استفاده قرار می‌گیرد و یا به همراه DAPI جهت مشاهده سیگنال‌های سبز استفاده می‌شود. Propidium Iodied می‌تواند قسمتی از زمینه سبز را روی کروموزوم‌ها یا هسته‌ها بپوشاند و کیفیت نمونه‌ها را افزایش دهد، بنابراین در سیستم‌های مرتبط با Texas Red و Rhodamin، سلول‌ها نمی‌توانند توسط Propidium Iodied رنگ بپذیرند، چون سیگنال‌های قرمز بوسیله رنگ زمینه‌ای قرمز ناشی از Propidium Iodied پوشیده خواهند شد.

Citifluor یک ماده مرسوم جهت جلوگیری از محو شدن سیگنال‌ها در مقابل ماده زمینه‌ای توسط نور فلوروسانت است.

محل‌های هیبریداسیون بوسیله فلوروکروم‌ها و توسط یک میکروسکوپ اپی‌فلوروسنس و فیلترهای اختصاصی برای مشاهده فلوروکروم‌های آبی (جهت DAPI)، سبز (جهت FITC) و قرمز (جهت Rhodamin, Propidium Iodied و Texas Red) بکار می‌رود.

میکروسکوپ تصویربرداری دیجیتال Digital imaging microscopy می‌تواند جهت بهبود تشخیص سیگنال‌های ایجاد شده، در مقایسه با میکروسکوپ معمولی بکار گرفته شود. ماده قابل تشخیص بوسیله چشم، مشخص و فوکوس شده و سپس تصویر بوسیله یک دوربین ثبت گردیده و روی مونیتور ظاهر می‌شود. این سیستم دارای مزیت‌ها و قابلیت‌های تجزیه و تحلیل تصاویر و بهبود کیفیت آنهاست. امروزه سیستم حساسی بنـــــــام دوربین CCD (Charged Coupled device) در دسترس قرار گرفته است که این سیستم اجازه

تشخیص سیگنال‌های فلوروسانت که با چشم معمولی قابل مشاهده نیستند را می‌دهد، اما این سیستم برای آزمایشگاه‌های تشخیصی ضروری نیست. یکی از کاربردهای اصلی سیستم‌های تصویربرداری دیجیتالی، تولید رنگ‌های کاذب پس از هیبریداسیون نشاندار کردن نسبی[1] است که اجازه می‌دهد تا تفاوت‌های موجود بین رنگ‌های حد واسطی که با چشم معمولی به سختی تشخیص داده می‌شود، بوضوح از هم مشخص گردد.

۷-۱- سیتوژنتیک سرطان:

اولین گزارش در مورد سیتوژنتیک سرطان در سال ۱۹۶۰ توسط Nowell و Hungerfod و به هنگام کشف یک مارکر کوچک کاریوتایپی به عنوان کروموزوم فیلادلفیا (Ph)Philadelphia Chromosom در بیماران با لوسمی میلوئیدی مزمن[2] کشف شد. این اولین ناهنجاری کروموزومی ثابت در یک سرطان انسانی بود. در دو دهه اخیر، مطالعات FISH پیشرفت‌های چشمگیری را در تشخیص ناهنجاری‌های موجود در سلول‌های متافازی و اینترفازی لوسمی موجب شده است.

لوسمی میلوئید مزمن یک نوع ناهنجاری مربوط به توده سلول‌های بنیادی است که با ازدیاد تولید سلول‌های مغزاستخوان در تمامی مراحل تمایز همراه است و اغلب در افراد میانسال مشاهده می‌شود. CML برای اولین بار در قرن نوزدهم شناخته شد و مطالعات انجام گرفته روی موارد بالینی و مورفولوژیک آن متمرکز گردیده است.

در حدود ۲۰-۱۵٪ لوسمی‌ها در افراد بزرگسال مربوط به CML است. این بیماری در افراد مذکر بیش از افراد مؤنث اتفاق می‌افتد (نسبت ۱:۱/۳).

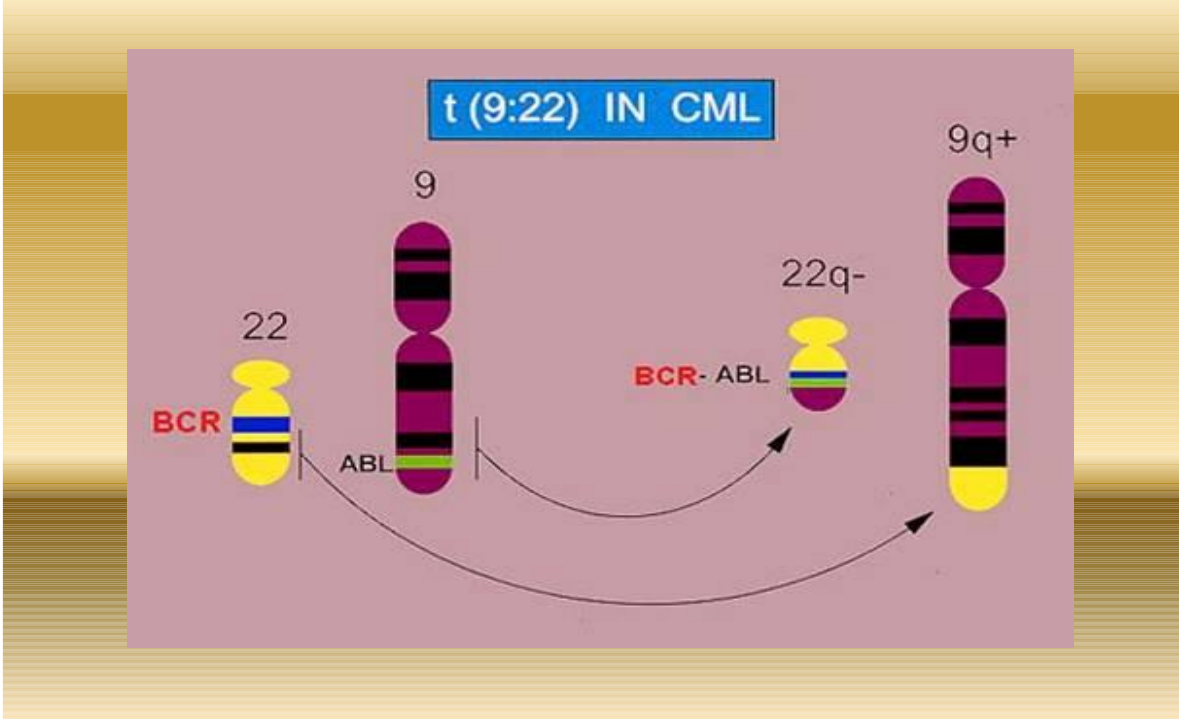
در اوایل کشف این بیماری، امکان تعیین اینکه کروموزوم‌های کوچک گروه G در تشکیل کروموزوم فیلادلفیا دخیل هستند میسر نبود، بنابراین با پیشرفت روش Banding در دهه ۱۹۷۰ مشخص گردید که کروموزوم فیلادلفیا در حقیقت یک جابجایی یا Translocation بین کروموزوم ۹ و ۲۲ است t(9;22)(q34;q11).

در طی دهه ۱۹۸۰ یک سری تحقیقات نشان داد که پروتوانکوژن ABL روی کروموزوم ۹ بصورت جابجایی دوجانبه (Reciprocall Translocation) روی کروموزوم ۲۲ و در نزدیکی ناحیه ژن BCR قرار می‌گیرد.

---

[1] .**Ratio-labelling**

[2] **. Chronic Myeloid Leukemia**

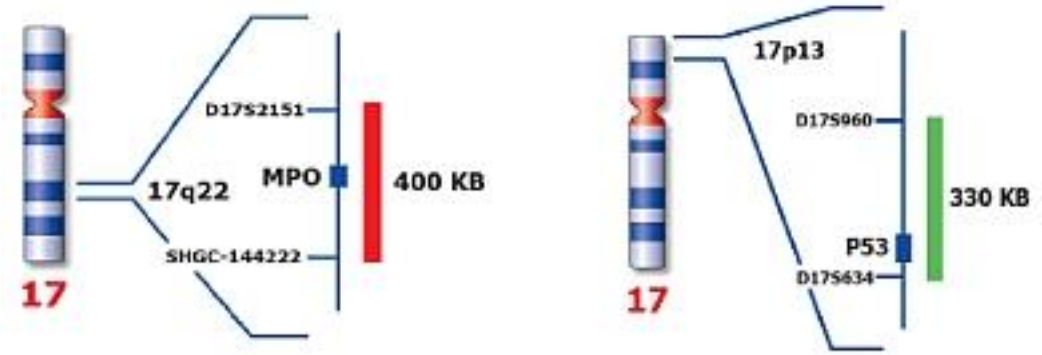


۸-۱- کاربرد FISH تک رنگی، دو رنگی و چند رنگی در تشخیص لوسمی‌ها:

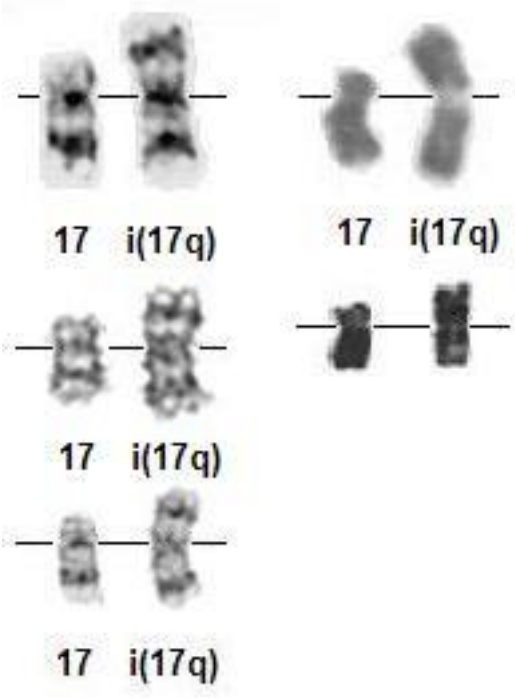
روش FISH در اشکال مختلف تک رنگی، دو رنگی و چند رنگی (شکل ۷-۱، ۸-۱ و ۹-۱) کاربرد وسیعی در تحقیقات و نیز در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی دارد (جدول ۱-۱).

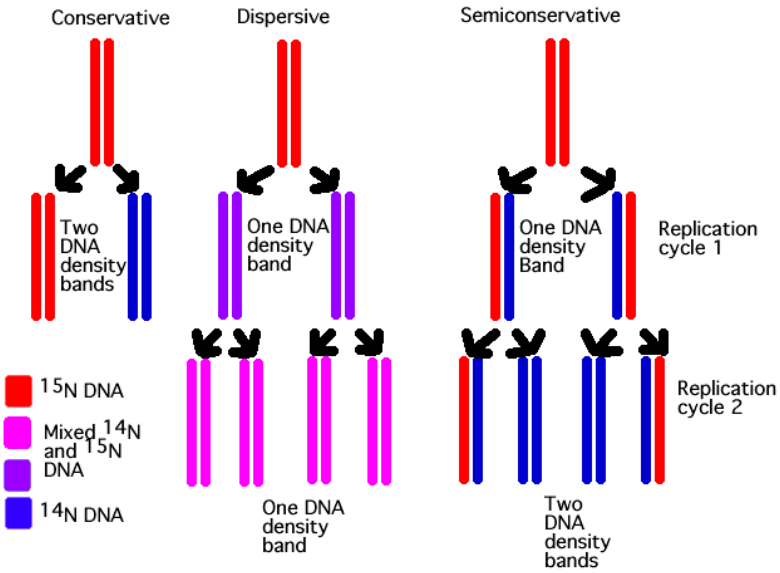
Nakagawa و همکارانش در سال ۱۹۹۲ حذف بازوی P کروموزوم ۱۷ را در CML با استفاده از این روش نشان دادند.

در این حالت یک ایزوکروموزوم شماره ۱۷ یا I(۱۷q) بوجود آمده بود که با استفاده از پروب سانترومری α-satellite، اختصاصی برای کروموزوم ۱۷ شناخته شد.

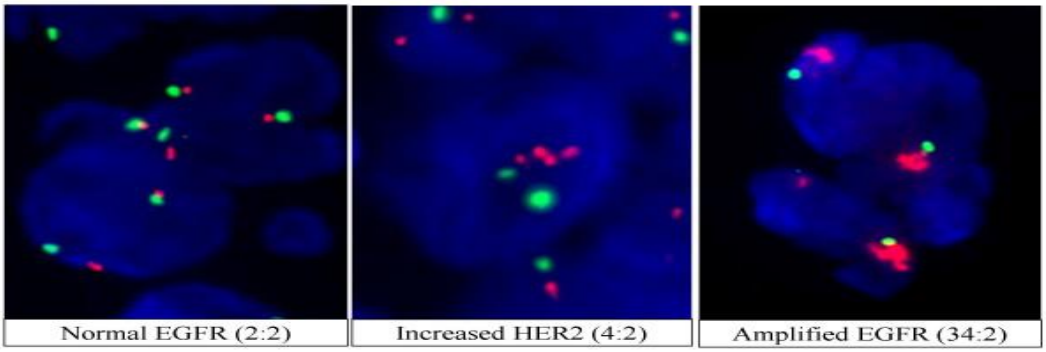


نمای شماتیک از ایزوکروموزومی بازی بلند کروموزوم ۱۷

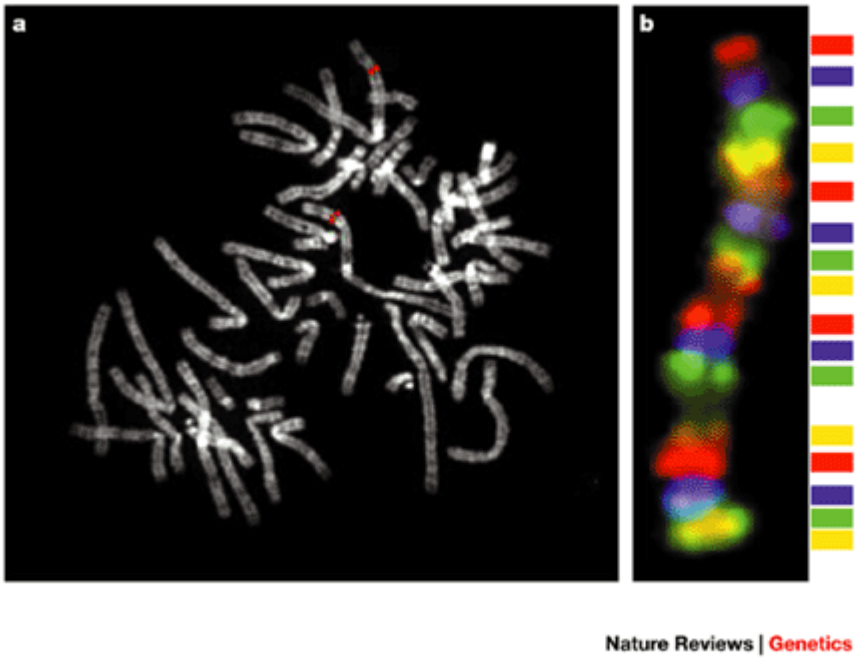




شکل۷-۱: نمای شماتیک از FISH تک رنگی



شکل ۸-۱: نمای میکروسکوپیک FISH دو رنگی



شکل ۹-۱: نمای شماتیک FISH چند رنگی

جدول ۱-۱: کاربرد هیبریداسیون فلورسنس درجا از نظر بالینی و تحقیقاتی

تحقیقاتی	کلینیکی
• جایگزینی کروموزومی و ژنهای موجود در ارتباط آن با ترادف DNA • تظاهر ژن • مطالعه تومورهای بیولوژیک • تشخیص ترادف ویروسی در سلولها • آزمایش و تجزیه و تحلیل هیبریداسیون سلولهای سوماتیک • تشخیص تزاید در ژن • تجزیه و تحلیل کروموزومهای ناهنجار • تهیه نقشه سیتوژنتیکی	• در سیتوژنتیک بالینی و همچنین در تشخیص های سرطانی • در تشخیص شماره‌ای و ساختمانی کروموزومهای ناهنجار • در تشخیص مارکرهای کروموزومی (باز آرایی کروموزومها) • تشخیص ناحیه نمونه‌برداری در پیوند مغز استخوان • در آزمایش کاریوتیپ نمونه سلولهای اینترفازی و یا غیر تقسیم شده • در تشخیص تزاید ژنی • در تعیین موقعیت ژنهای حامل بیماری و تشخیص بیماریهای عفونی

علاوه بر همه این مسائل، مطالعه بازآرایی‌های کروموزومی بوسیله روش‌های FISH تک رنگی و چند رنگی امکان پذیر است (کارهای Kibbelaar و همکارانش در سال ۱۹۹۲).

REFERENCES:

- Brown T.A.(2010):Gene Cloning & DNA analysis,6th edn.Blackwell science.

Albrts B.& Johanson A.and et al.(2002):Molecular Biologhy of the Cell.4th edn.NEW YORK:Garland science Publications.

- Bernard R.G.& Pasternak J.J.(2003):Molecular Biologhy,3rd edn.Washington:ASM Press.
- Weaver R.F.(2002):Molecular Biologhy,2nd edn.Boston:Mc Grow-Hill.
- Winter P.C.& Hickey G.I.et al.(1998):Genetics,Bios scientific publication.
- Nessbaum R.L.et al.(2001):Genetics in Medicine,6th ed.W.B.Saunders Company.
- McPherson M.J.Moller S.G.(2001):PCR.New York Bios scientific publication.
- WWW.Gen X,Benjamin Lewin.com

in medicine.comWWW.Biotechnologhy

engineering Williams,Jeff G.comWWW.Genetic

- Old R.W.& Primrose S.B.(1994): principles of Gene Manipulation: an introducation to Genetic Engineering,5th ed.Blackwell science.
- Watsin J.D., Gilman M., Witkowski J. and Zoller M. (1999): Recombination DNA.2nd edn. New York:W.H.freeman.
- Kahl G.(2001): the Dictionary of Gene Technology,2nd edn.Wiley-VCH publication.

- Zhang HG,Hsu HC,Yang PA,Yang X,Wu Q,Liu Z, Yi N,and Mountz JD Identification of multiple genetic loci that regulate adenovirus gene therapy. Gene Therapy 2004