

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть  
12 февраля 2010 г.  
Регистрационный № 118-1109

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД  
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИИ (FISH) В  
ДИАГНОСТИКЕ СЛОЖНЫХ ФОРМ ХРОМОСОМНОЙ ПАТОЛОГИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-  
практический центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ: канд. биол. наук А.Д. Политыко, канд. мед. наук И.В. Наумчик,  
О.М. Хурс, Л.В. Исаакович

Минск 2010

Инструкция предназначена для специалистов НИИ, медицинских НПЦ, занимающихся лабораторной диагностикой генетических заболеваний.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **Оборудование и материалы**

- флуоресцентный бинокулярный микроскоп профессионального класса с иммерсионным объективом  $\times 100$ , объективами  $\times 20/40/60$  и набором флуоресцентных фильтров
- лабораторная термоплита с максимальной температурой нагрева не менее  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$
- инкубатор (обеспечение температуры  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
- центрифуга лабораторная (1000–3000 об/мин, 120g)
- вортекс
- лабораторная баня с максимальной температурой нагрева не менее  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$
- вытяжной шкаф
- комплект автоматических микропипеток с наконечниками
- предметные стекла
- покровные стекла
- эппендорф-пробирки объемом 0,5–1 мл, 1–2 мл
- гибридизационная камера
- стеклянные стаканы объемом 80–100 мл

### **Реагенты**

- флуоресцентные ДНК-пробы
- гибридизационный буфер
- стерильная дистиллированная  $\text{H}_2\text{O}$
- кислота  $\text{HCl}$  (1N)
- пепсин (активность 570 ед/мг)
- соль  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (хч или чда)
- соль  $\text{NaCl}$  (хч или чда)
- соль  $\text{KCl}$  (хч или чда)
- соль  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (хч или чда)
- соль  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (хч или чда)
- соль  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (хч или чда)
- формальдегид (37%)
- NP-40, Tween
- растворы DAPI, PI
- раствор Vectashild
- резиновый (каучуковый) клей
- иммерсионное масло для флуоресцентной микроскопии

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Молекулярно-цитогенетическая диагностика (пре- и постнатальная) хромосомной патологии методом FISH проводится пробандам с

множественными врожденными пороками развития и предполагаемой хромосомной аномалией, которая не выявлена или не уточнена при стандартном анализе GTG-окрашенных хромосом, в семьях с нарушением репродуктивной функции, пациентам с клинически предполагаемыми синдромами микроделений (синдромы Ангельмана, Вилльямса, Вольфа-Хиршхорна, Ди Джорджи/del22q11.2, Миллера-Дикера, Прадера-Вилли, Смита-Маджениса и др.), а также с аномальными хромосомами неуточнённой природы.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

### **Приготовление растворов**

1. Первичный раствор 0,2N HCl : 20 мл HCl (1N) + 80 мл H<sub>2</sub>O (хранить при комнатной температуре).

2. Рабочий раствор 10 ммоль HCl : 5 мл 0,2N HCl + 95 мл H<sub>2</sub>O.

3. Рабочий раствор пепсина: 20 мг пепсина + 1 мл H<sub>2</sub>O (разлить по 0,5 мл, хранить при температуре -20 °C).

4. Раствор 1M MgCl<sub>2</sub>: 50,825g MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O довести H<sub>2</sub>O до 250 мл.

5. Раствор PBS pH 7,0 (№ 1 и № 2):

0,1 M NaCl (8 г/л)

0,003 M KCl (0,2 г/л)

0,008 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,15 г/л)

0,00147 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 г/л).

6. Раствор формальдегида в PBS/MgCl<sub>2</sub>:

250 мкл 1M MgCl<sub>2</sub>

150 мкл формальдегида

4,5 мл PBS.

7. 20×SSC pH 5,3 (довести pH, используя 1M HCl):

175,3 г NaCl

88,2 г Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>•2H<sub>2</sub>O

800 мл H<sub>2</sub>O

Соли растворить и довести объем раствора H<sub>2</sub>O до 1000 мл. Хранить при комнатной температуре. Срок хранения до 6 мес.

8. 2×SSC pH 7,0±0,2 (довести pH, используя 1M NaOH):

100 мл 20×SSC

850 мл H<sub>2</sub>O

Тщательно перемешать, довести объем раствора H<sub>2</sub>O до 1000 мл. Хранить при комнатной температуре. Срок хранения до 6 мес.

9. 2×SSC/0,1% NP-40 pH 7,0±0,2 (довести pH, используя 1M NaOH):

950 мл 2×SSC

1 мл NP-40

Перемешать до полной гомогенизации, довести объем раствора H<sub>2</sub>O до 1000 мл. Хранить при комнатной температуре в течение 6 мес.

10. 0,4×SSC/0,3% NP-40 рН 7,0–7,5 (довести рН, используя 1М NaOH):

20 мл 20×SSC

950 мл H<sub>2</sub>O

3 мл NP-40

Перемешать до полной гомогенизации, довести объем раствора H<sub>2</sub>O до 1000 мл. Хранить при комнатной температуре в течение 6 мес.

11. Батарея спиртов (№ 1 и № 2) — 70, 85 и 96%. Сохранять герметично закрытыми при комнатной температуре. Сменить растворы, если не соблюдена герметичность.

12. Рабочий раствор DAPI или PI.

### **Приготовление цитогенетических препаратов для FISH**

#### *Принципы приготовления цитогенетических препаратов*

Для FISH используются цитогенетические препараты лимфоцитов периферической крови, фибробластов, клеток буккального эпителия, амниотической жидкости, ворсин хориона или плаценты. Взятие образцов биологического материала и культивирование клеток выполняется по стандартным методикам.

Гибридизация *in situ* молекулярной ДНК-пробы на хромосому-мишень проводится на определенном ограниченном участке предметного стекла. Данный участок цитогенетического препарата должен содержать достаточное количество клеточного материала и обязательное число метафазных пластинок. Поэтому суспензия клеток для раскапывания должна иметь несколько большую концентрацию клеточного материала в сравнении с концентрацией, используемой при приготовлении препаратов для окраски GTG-методом. Оптимальное разведение суспензии достигается эмпирическим путем. При выполнении FISH на препаратах, получаемых методом раскапывания суспензии (амниотическая жидкости, ворсины хориона), необходимо выбрать зону с максимальным количеством метафаз. Препарат для FISH должен быть приготовлен за 3 сут до выполнения гибридизации и храниться при комнатной температуре.

#### *Оценка качества цитогенетических препаратов*

Качество цитогенетических препаратов оценивается с использованием светового микроскопа при кратности увеличения ×200. Предъявляемые требования к препарату – высокая плотность материала на стекле, обособленность метафазных пластинок друг от друга, цельность метафазных пластинок.

#### *Предварительная ферментативная обработка препаратов*

(для препаратов всех клеточных культур, кроме амниотической жидкости):

1. Нагреть 100 мл раствора 10 ммоль HCl до 37 °С.

2. Перед началом обработки препарата добавить в HCl 0,5 мл рабочего раствора пепсина.

3. Инкубировать препарат в рабочем растворе пепсина при 37 °С 5 мин.

4. Отмыть препарат в буфере PBS № 1 при комнатной температуре в течение 5 мин.

5. Инкубировать препарат в растворе формальдегида при комнатной температуре 10 мин (100 мкл раствора нанести на зону гибридизации и покрыть покровным стеклом).

6. Отмыть препарат в буфере PBS № 2 при комнатной температуре в течение 5 мин.

7. Провести препарат через батарею спиртов № 1 (70, 85 и 100%) по 3 мин в каждом.

### **Проведение FISH**

#### *Приготовление флуоресцентной ДНК-пробы*

При работе с флуоресцентными компонентами реактивов необходимо избегать попадания прямого освещения (естественного и искусственного).

В диагностике используют: LSI — локус-специфические молекулярные ДНК-пробы, WCP — цельнохромосомные ДНК-пробы, другие разновидности олигонуклеотидов.

1. Разморозить при комнатной температуре и тщательно ресуспендировать компоненты гибридизационной смеси (проба и гибридизационный буфер): центрифугировать в микроцентрифуге в течение 1–3 с; тщательно перемешать на вортексе. Повторить дважды.

2. Смешать в эппендорф-пробирке следующие компоненты гибридизационной смеси в пропорциях согласно указаниям фирмы-производителя:

гибридизационный буфер

ДНК-проба

дистиллированная H<sub>2</sub>O

Размер зоны гибридизации на цитогенетическом препарате приводится в строгое соответствие с объемом гибридизационной смеси, необходимо соблюдать следующие пропорции:

24×50 мм<sup>2</sup> — 10 мкл,

18×18 мм<sup>2</sup> — 5 мкл.

3. Полученную гибридизационную смесь тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в микроцентрифуге в течение 1–3 с.

#### *Проведение кодентурации и гибридизации*

1. Предварительно подготовить и поставить в инкубатор гибридизационную камеру. В качестве последней может быть использована герметично закрывающаяся емкость объемом не более 0,5 дм<sup>3</sup>, способная сохранять заданную температуру и высокую влажность в течение 1 сут. Не допускается пересыхания камеры в течение гибридизации. Стенки камеры выкладывают слоем фильтровальной бумаги и обильно увлажняют дистиллированной водой, дно заполняют дистиллированной водой слоем примерно 0,5 см, помещают штатив для удержания стеклопрепарата в горизонтальном положении.

2. Нагреть лабораторную термopлиту до необходимой температуры (табл.).

3. Нанести необходимый объем пробы на зону гибридизации препарата и немедленно накрыть покровным стеклом (не допускать образования воздушных пузырей).

4. Заклеить края покровного стекла резиновым (каучуковым) клеем, не оставляя промежутков (рекомендуется добиться полного высыхания клея).

5. Поместить препарат на поверхность лабораторной термоплиты и провести денатурацию при нужной температуре необходимое время (табл.).

6. Положить препарат горизонтально в подготовленную гибридизационную камеру и поместить в термостат на необходимый период гибридизации (табл.).

Таблица

Условия проведения FISH для основных видов ДНК-проб

Проба	Температура денатурации	Время денатурации	Температура гибридизации	Время гибридизации
WCP	68–75°	5 мин	37°	18 ч
LSI	73–75°	3–5 мин	37°	18 ч

#### *Краткая отмывка препаратов*

По окончании времени гибридизации производится отмывка препарата. Для получения четких качественных флуоресцентных сигналов на ДНК-мишени необходимо соблюдение следующих требований.

Условия соблюдения качества:

- избегать попадания прямого освещения на препарат;
- для соблюдения требуемых температурных режимов промывочных растворов контроль температуры выполнять как в водяной бане, так и внутри стаканов с растворами;

- объем промывочного раствора рассчитан на отмывку 4 препаратов. Если отмывке подвергаются меньшее число препаратов, вставить в стакан недостающие «балластные» препараты для обеспечения заданного температурного режима

- время промывки отсчитывается с момента погружения последнего препарата.

1. Налить 70 мл 0,4×SSC/0,3%NP-40 промывочного раствора, довести температуру раствора внутри стакана до 73±1 °С (стакан помещается в водяную баню за 30 мин до проведения процедуры отмывки).

2. Налить 70 мл 2×SSC/0,1%NP-40 промывочного раствора, использовать при комнатной температуре.

3. Налить 70 мл дистиллированной H<sub>2</sub>O, использовать при комнатной температуре.

Промывочные растворы использовать в течение дня.

4. Удалить покровное стекло с препарата и немедленно поместить

препарат в стакан с 0,4×SSC/0,3%NP-40, встряхивать 1–3 с. Отмывать препарат в течение 2 мин.

5. Поместить препарат в стакан с 2×SSC/0,1%NP-40, встряхивать 1–3 с. Отмывать препарат в течение 1 мин.

6. Поместить препарат в стакан с дистиллированной H<sub>2</sub>O, встряхивать 5 с.

7. Провести препарат через батарею спиртов № 2 в последовательности 70, 85 и 96% по 1 мин в каждом.

8. Высушить препарат до полного испарения спирта.

Примечание. Иногда после высыхания на поверхности препарата образуется видимая пленка; обычно она не дает флуоресценции и не мешает анализу.

9. Нанести 10 мкл раствора основного красителя на область гибридизации и накрыть покровным стеклом. Для флуорохромов green или aqua использовать PI или DAPI, для orange — только DAPI.

10. Препараты хранить в темноте при температуре -20 °С.

#### **Цитогенетический анализ FISH и интерпретация результата**

Анализ препарата проводится с использованием флуоресцентного микроскопа с набором соответствующих фильтров. Флуоресцентные сигналы на хромосомах-мишенях должны быть достаточно интенсивными и иметь четкие очертания. Анализ сигналов на метафазных хромосомах включает просмотр не менее 20–25 метафаз при отсутствии мозаицизма. Для уточнения мозаичного статуса кариотипа просматривают 100 метафаз и более. В исследование включаются метафазы, в которых на обеих анализируемых гомологичных хромосомах идентифицируются контрольные флуоресцентные сигналы, входящие в состав ДНК-пробы. Анализ сигналов на интерфазных хромосомах включает просмотр не менее 50 интерфазных клеток. Для уточнения мозаичного статуса кариотипа просматривают 500 интерфаз и более.

Пример интерпретации результатов анализа утраты/наличия флуоресцентных сигналов критической области представлен на рис.



**Рис. Схематическое изображение расположения критического и контрольного локусов-специфических флуоресцентных сигналов на исследуемой хромосоме-мишени: А — отсутствие микроделеции, Б — наличие микроделеции критической области**

Цитогенетический анализ завершается протоколированием результатов, внесением фотографий в компьютерную базу данных.

#### *Примеры записи кариотипов*

Кариотип пациента, изученный с помощью молекулярно-цитогенетического метода FISH, записывают согласно правилам Международной системы номенклатуры хромосом человека (ISCN) с указанием вида использованной для диагностики ДНК-пробы.

*Пример 1.* 47,XY,+mar.ish inv dup(18)(p10)(wcp18+). Запись означает: в результате стандартного цитогенетического анализа в мужском кариотипе установлено общее число хромосом, равное 47, в т.ч. обнаружена добавочная маркерная хромосома. Запись этой информации ограничена точкой. Далее без интервала следует аббревиатура ish, означающая «in situ hybridization», и после интервала записаны результаты молекулярно-цитогенетических исследований: Маркерной является хромосома, образованная посредством инвертированной дупликации короткого плеча хромосомы 18 вокруг точки центromеры 18p10.

#### *Пример 2.*

Правила записи кариотипа в случаях обнаружения микроделеции критического локуса:

46,XX.ish del(7)(q11.23q11.23)(ELN-,LIMKI-,D7S613-)

46,XY.ish del(15)(q11.2q11.2)(SNRPN-)

46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE-)

Правила записи кариотипа в случаях отсутствия микроделеции критического локуса:

46,XX.ish 7q11.23(ELN×2,LIMKI×2,D7S613×2)

46,XY.ish 15q11~13(D15S10×2)

46,XY.ish 22q11.2(N25×2).

По завершении анализа оформляется заключение о результатах молекулярно-цитогенетической диагностики (приложение).



Учреждение МЗ РБ  
Юридический адрес  
Подразделение учреждения, выполнившее диагностику

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКИ**

ФИО пациента: \_\_\_\_\_ дата рождения \_\_\_\_\_

Кем направлен: \_\_\_\_\_

Клинический диагноз: \* синдром Прадера-Вилли \_\_\_\_\_

Цитогенетический диагноз: \_\_\_\_\_ \*46,XX \_\_\_\_\_

Биологический образец: \* лимфоциты периферической крови \_\_\_\_\_

Проведено исследование с помощью молекулярно-цитогенетического метода FISH с применением локус-специфической ДНК-пробы LSI PWS/AS Region Probe — LSI SNRPN Spectrum Orange /CEP15 D15Z1 Spectrum Green /PML Spectrum Orange (Vysis).

**Заключение:** \*46,XX.ish 15q11~13(SNRPN×2)

**Интерпретация результата:** \*отсутствует делеция SNRPN

**Рекомендовано:** \*Молекулярная диагностика однородительской дисомии хромосомы 15.

Анализ выполнил:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Дата анализа: \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

\*информация приведена в качестве примера.