

# FYZICKÁ LOKALIZACE REPETITIVNÍCH SEKVENCÍ DNA NA ROSTLINNÝCH CHROMOZOMECH – FISH & PRINS

## ÚVOD

### Fyzické cytogenetické mapování

K důležitým informacím o struktuře genomu patří lokalizace sekvencí DNA přímo na chromozomech nebo v jádrech pomocí techniky *in situ* hybridizace (ISH). Tato technika byla poprvé nezávisle použita ve dvou laboratořích (Gall & Pardue 1969, John *et al.* 1969) a je založena na specifickém párování komplementárních sekvencí DNA nebo RNA (cílové sekvence a značené sondy). V prvních experimentech se DNA sondy značily radioaktivními izotopy ( $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ). Detekce radioaktivních signálů trvala až několik týdnů a doba expozice záležela na množství a koncentraci navázané sondy, nebylo ji možné dopředu odhadnout a proto bylo vždy připraveno několik preparátů, které byly postupně vyvolávány (Wilcox 1993). Nevýhodou radioaktivně značených sond je malé prostorové rozlišení. Tento problém byl odstraněn o deset let později, rozvojem neizotopové *in situ* hybridizace.

Langer-Safer *et al.* (1982) představili neizotopovou *in situ* hybridizaci na chromozomech druhu *Drosophila* a Rayburn & Gill (1985) tuto techniku aplikovali na rostlinné chromozomy pšenice. Sondy byly detekovány díky fluorochromům, na základě enzymatické kolorimetrické reakce nebo pomocí protilátek nesoucích mikročástice kovů v elektronovém mikroskopu (Fuchs & Schubert 1998). Dnes je nejpoužívanější metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Alternativní metodou k FISH je primed *in situ* labelling (PRINS).

### Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Principem fluorescenční *in situ* hybridizace je hybridizace chromozomů nebo jader na mikroskopickém skle se značenou sekvencí DNA - sondou. Sekvence DNA se mohou značit přímo fluorescenčním barvivem (fluorescein, Cy3, aj.) nebo nepřímo (digoxigenin, biotin), kdy je pro vizualizaci hybridizačního signálu nutné použít specifickou protilátku nebo jiný protein konjugovaný s fluorescenčním barvivem. Jako sonda se může použít i celková genomová DNA daného druhu, v tomto případě mluvíme o tzv. genomové *in situ* hybridizaci (GISH).

Naznačená sonda je přidána k hybridizační směsi (obvykle formamid, citrát sodný, 10% dextransulfát). Hybridizační směs se sondou je napipetována na podložní sklo s preparátem, uzavřena krycím sklem a denaturována při 70-80°C. Hybridizace probíhá při 37°C nebo 42°C přes noc ve vlhké komůrce. Koncentrace formamidu a SSC v hybridizační směsi udává stringenci hybridizační reakce (Schwarzacher & Heslop-Harrison 2000). Obvykle se volí hodnota stringence 70-87%, což znamená, že budou hybridizovat všechny fragmenty DNA, které mají alespoň 70-87% homologii. Stringence je dána vztahem (Schwarzacher & Heslop-Harrison 2000):

## **Stringence= 100 – M<sub>f</sub>(T<sub>m</sub> – T<sub>a</sub>)**

T<sub>a</sub>= aktuální teplota hybridizačních nebo vymývacích roztoků

M<sub>f</sub>= mismatch faktor, lineární závislost mezi 1 (pro sondu delší než 150bp) a 5 (pro sondu kratší než 20bp).

T<sub>m</sub>= teplota tání hybridních molekul

### **T<sub>m</sub> pro DNA:DNA hybridní molekuly pro sondu dlouhou 50bp (Meinkoth & Wahl 1984):**

T<sub>m</sub>= 0,41 (% GC sondy) + 16,6log (molarita monovalentních kationtů) – 500/(délka sondy) – 0,61 (% formamidu) + 81,5°C

### **T<sub>m</sub> pro RNA:DNA je dána vztahem (Wilkinson 1992):**

T<sub>m</sub>= 0,58 (%GC sondy) + 0,0012 (%GC)<sup>2</sup> – 18,5log (molarita monovalentních kationtů) – 820/(délka sondy) – 0,35 (% formamidu) + 79,8°C

Nenavázaná sonda je po hybridizaci odmyta vymývacími roztoky (promývání probíhá vždy při vyšší stringenci než samotná in situ hybridizace), chromozomy jsou obvykle vizualizovány pomocí DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindol) nebo propidium jodidu a fluorescenční signály jsou snímány fluorescenčním mikroskopem. Síla hybridizačního signálu se dá zvýšit kombinací několika protilátek, tzv. amplifikací signálu. Naopak vysoké pozadí nebo repetitivní sekvence DNA, které „kontaminují“ sondu, se dají potlačit použitím neznačené blokovací DNA nebo specifické C<sub>0</sub>-DNA.

Rozlišení a citlivost FISH je ovlivněna také kvalitou preparátů a kondenzací metafázních rostlinných chromozomů (Khrustaleva & Kik 2001). Prostorové rozlišení se pohybuje se od 1 do 3 Mbp (Heng & Tsui 1998, Raap *et al.* 1996) a umožňuje rozpoznat pouze rozsáhlé strukturní změny chromozomů. Citlivost závisí na stupni kondenzace chromozomů, obecně však platí, že u rostlin lze mapovat sekvence dlouhé okolo 8 až 10 kb (Lehfer *et al.* 1993, Valárik *et al.* 2004, Lamb *et al.* 2007). Vyššího rozlišení a nebo mapování sekvencí DNA kratších než 8 kb lze dosáhnou použitím specifických typů preparátů – preparáty pachyténích chromozomů, preparáty natříděných chromozomů, fibre FISH.

### **Primed in situ labelling (PRINS)**

Další metodou cytogenetického mapování je tzv. „primed in situ labelling“ (PRINS, Koch *et al.* 1989), která je ve srovnání s FISH podstatně jednodušší a časově mnohem kratší. Principem této metody je PCR na sklíčku. Směs fluorescenčně značených nukleotidů, specifických primerů a DNA polymerázy (v prostředí příslušného pufru) jsou napipetovány do rámečku upevněného na podložním sklíčku s templátovou DNA (chromozomy). V případě PRINS probíhá pouze jeden cyklus reakce, která se skládá z denaturace (5 min, 91°C), nasednutí specifických primerů na DNA vlákno chromozomu (annealing, 15 min při 55°C) a extenze (30 min při 72°C). V případě C-PRINS (cyklická PRINS) je reakce kratší (standardní C-PRINS: denaturace 1 min 91°C, annealing 1 min 55°C a extenze 1-3 min 72°C), ale cyklicky opakovaná (10 – 30 krát).

V rostlinné cytogenetice se PRINS používá hlavně pro mapování repetitivních sekvencí DNA (Macas *et al.* 1995, Kubaláková *et al.* 1997), a to zejména tandemově se opakujících repetitivních jednotek. Detekční limit PRINS se pohybuje okolo 20 kb a jistou nevýhodou této metody je relativně vysoké pozadí. Modifikací této metody je metoda PRINSES (PRINS en suspension, Macas *et al.* 1995), která byla úspěšně použita k diskriminaci a třídění jinak nerozlišitelných chromozomů linií ACB bobu pomocí průtokové cytometrie (Pich *et al.* 1995).

# PROVEDENÍ

## PRINS – Primed *in situ* labelling

### 1. Materiál a pracovní postup

Mikroskopické sklíčko s natříděnými rostlinnými chromozómy (chromozómy byly natříděny pomocí průtokového cytometru). Okolo dobře viditelné oblasti chromozómů nalepíme speciální oboustranně samolepící rámeček (Hybaid), nakápneme reakční směs, přilepíme plastické víčko, které se dodává s rámečkem. Sklíčka položíme na MJ Research cycler s nástavcem pro mikroskopická sklíčka. Provedeme reakci, která se skládá z denaturace při 91°C po dobu 5 min, nasednutí primerů při teplotě specifické pro daný primer po dobu 15 minut a syntézy nového značeného úseku DNA pomocí polymerázy při teplotě 72°C po dobu 30 minut. Nakonec reakci zastavíme pomocí stop pufru (0.5 M NaCl, 0.05 M EDTA, pH 8.0) při 70°C, 3x promyjeme washing pufr (0.1 M kys. maleinová, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5). Preparát zavřeme do montovacího media Vectashield s příslušným fluorochromem DAPI nebo PI a přilepíme krycí sklíčko.

	Množství použitých reagensí [ul] (pro výsledný objem = 25ul)	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace
PCR pufr		10x	1x
MgCl <sub>2</sub>		25mM	2,5mM (až 5mM)
dATP, dCTP, dGTP		1mM	0,1mM
dTTP		0,2mM	0,01mM
fluorescein-12-dUTP		0,1mM	0,004mM
Taq DNA polymeráza		2 U/ul	3 U/50ul
Specifický primer		10uM	1uM
Deionizovaná sterilní H <sub>2</sub> O			

### 2. Vyhodnocení experimentálních dat

Signály sond a morfologii chromozómů pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu a to ve filtrech pro jednotlivé fluorochromy. Obrázky příslušných sond a chromozómů snímáme jednotlivě černobílou kamerou a následně je v počítači složíme v příslušných barvách. Porovnáme počet a sílu signálů (silných pruhů nebo klastrů) na natříděném chromozómu a pokud je to možné, dle přiloženého karyotypu určíme chromozóm respektive fragment chromozómu. Takto prohlédneme asi 50 částic (chromozómů) a zjistíme % zastoupení jednotlivých typů chromozómů a kontaminujících částic v pozorovaném vzorku (čistota třídění).

### 3. Vybavení laboratoře

Master Cycler (PCR cycler od firmy Eppendorf) s nástavcem pro mikroskopická sklíčka  
Fluorescenční mikroskop - Olympus BX60 (Olympus Optical Co.)  
Chlazená černobílá kamera s vysokým rozlišením a PC s ISIS softwarem (Metasystems GmbH)

### 4. Chemikálie a použité roztoky

dTTP, dATP, dCTP, dGTP (Fermentas)  
Fluorescein-12-dUTP (Roche Diagnostics)  
Dynazyme™ II DNA polymeráza (Finnzymes)  
Vectashield antifade solution with 4',6-diamidino-2-phenylidole (DAPI) (od firmy Vector Laboratories).  
Stop pufr (0,5 M NaCl a 0,05 M EDTA, pH 8)  
Promývací pufr (0,1 M kys. maleinová a 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7,5)

## FISH – Fluorescence *in situ* hybridization

### 1. Materiál a pracovní postup

Mikroskopické sklíčko s natříděnými rostlinnými chromozómy (chromozómy byly natříděny pomocí průtokového cytometru).

#### A) Stanovení koncentrace biotin- a digoxigenin- značených sond:

Pro “stanovení koncentrace” (intenzity značení) biotinem- nebo digoxigeninem- značených DNA sekvencí je nutné použít experimentální přístup, kdy je z přečištěné sondy vytvořena koncentrační řada a nanášena na nylonovou membránu. DNA je na membráně přichycena pomocí UV crosslinkeru. Jednotlivé signály koncentrační řady jsou poté detekovány jako v případě klasické Southern hybridizace:

- inkubace membrány v 5 x Pufu1; 5 min při RT
- inkubace v blokovacím pufru II v množství 0,5 ml/cm<sup>2</sup>; 30 min při RT
- přidat protilátku anti-digoxigenin AP nebo anti-biotin (1: 10000), inkubovat dalších 30 min při RT
- vymytí nenavázané protilátky v Pufu1 + 0,3% Tween 20; 2 x 15 min při RT
- (NEBO je možné použít příslušný KIT pro detekci takto značených sond...)
- opláchnout membránu v redestilované vodě a zakápnout chromogenním substrátem BM Purle AP (Roche).
- kyvetku zabalit do alobalu a inkubovat 30 – 45 min.

#### B) Příprava hybridizačního mixu pro výsledný objem V = 25 ul:

	Množství použitých reagensí [ul] (pro výsledný objem = 25ul)	Koncentrace zásobního roztoku	Výsledná koncentrace
Formamid		100 %	*
SSC		20x	*
Sonda značená biotinem		**	1 ng/ul
Sonda značená digoxigenonem		**	1 ng/ul
Salmon sperm DNA (blokovací)		10 ug/ul	250 ng/ul
Dextran sulfát		50 %	10 %
Deionizovaná sterilní H <sub>2</sub> O			

\* Koncentrace formamidu a SSC udává stringenci – viz příložená tabulka (Schwarzacher & Heslop-Harrison 2000).

\*\* Dle experimentálně stanovené koncentrace připravené sondy.

Do sterilních ependorfeek napipetujeme postupně formamid, sondy, blokovací DNA, SSC, vodu a nakonec dextran sulfát – ušříženou špičkou. Zvortexujeme, stočíme a celkový objem napipetujeme na mikroskopické sklíčko s natříděnými chromozomy. Připkryjeme krycím sklíčkem a denaturujeme při 80°C po dobu 40 s - 1 min. Po denaturaci přeneseme do hybridizační komůrky a necháme hybridizovat při 37°C přes noc.

#### C) Vymývání nenavázané sondy:

Roztok	Čas	Teplota
2xSSC	10 min	42°C na třepačce
0,1SSC+2mM MgCl <sub>2</sub> + 0,1% Tween	5 min	42°C na třepačce
2xSSC	10 min	42°C na třepačce
2xSSC	10 min	RT na stole
4xSSC + 0,2% Tween	10 min	RT na stole

#### D) Detekce signálů:

- na sklíčka napipetovat 60 μl blocking pufru, přikryt parafilmem, inkubovat (5-)15 min při RT ve vlhkém prostředí
- opakovat předchozí krok

- napipetovat 60 µl blocking pufu s protilátkami – anti-DIG FITC (1:200) + streptavidin-Cy3 (1:1000), přikrýt parafilmem, inkubovat 1 h při 37°C
- odmýt protilátky 3x5 min v předeřátém 4xSSC, 0,2% Tween při 40°C

V případě amplifikace signálu:

2. protilátka - na sklíčka napipetovat 60 µl blocking pufu, přikrýt parafilmem, inkubovat (5-)15 min při RT

- opakovat předchozí krok

- napipetovat 60 µl blocking pufu s protilátkami – anti-sheep FITC (1:60) + biotinylovaný streptavidin (1:100), přikrýt parafilmem, inkubovat 1 h při 37°C

- odmýt protilátky 3x5 min v předeřátém 4xSSC, 0,2% Tween při 40°C

3. protilátka - na sklíčka napipetovat 60 µl blocking pufu, přikrýt parafilmem, inkubovat (5-)15 min při RT

- opakovat předchozí krok

- napipetovat 60 µl blocking pufu s protilátkou – streptavidin Cy3 (1:1000), přikrýt parafilmem, inkubovat (30-) 60 min při 37°C

- odmýt protilátky 3x5 min v předeřátém 4xSSC, 0,2% Tween při 40°C

E) Uzavření sklíček - při použití pouze FITC je možno k Vectashieldu přidat propidium jodid (o koncentraci 0,2 µg/ml) , při použití obou fluorochromů FITC a Cy3 použijeme Vectashield s DAPI - 7 µl na sklíčko, uskladnit ve tmě

## 2. Vyhodnocení experimentálních dat

Signály sond a morfologii chromozomů pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu a to ve filtrech pro jednotlivé fluorochromy. Obrázky příslušných sond a chromozomů snímáme jednotlivě černobílou kamerou a následně je v počítači složíme v příslušných barvách.

Porovnáme počet a sílu signálů (silných pruhů nebo klastrů) na natříděném chromozómu a pokud je to možné, dle přiloženého karyotypu určíme chromozóm respektive fragment chromozómu. Takto prohlédneme asi 50 částic (chromozomů) a zjistíme % zastoupení jednotlivých typů chromozomů a kontaminujících částic v pozorovaném vzorku (čistota třídění).

## 3. Vybavení laboratoře

Master Cycler (PCR cycler od firmy Eppendorf) s nástavcem pro mikroskopická sklíčka  
Dávkovací mikropipety (Nichirio) + sterilní špičky (2 – 20 µl, 20 - 200 µl), chlazený stojánek nebo ledová tříšť, mikrozkuhavky, ochranné rukavice

Microscope slide incubator SM30 (hybridizační komůrka, Grant Instruments)

Fluorescenční mikroskop - Olympus BX60 (Olympus Optical Co.)

Chlazená černobílá kamera s vysokým rozlišením a PC s ISIS softwarem (Metasystems GmbH)

## 4. Chemikálie a použité roztoky

Pufr1 (0,1M kys. maleinová a 0,15M HCl, pH 7,5)

Blokovací pufr II (1 x Pufr1 a 1% blocking reagent)

Vectashield antifade solution with 4',6-diamidino-2-phenylidole (DAPI) (od firmy Vector Laboratories).

Formamide, (Fluka)

Calf thymus DNA (Sigma)

20xSSC - 175.3g NaCl, 88.2 Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> . 2H<sub>2</sub>O v 900ml deionizované vody, uprav pH 7 a sterilizuj autoklávováním.

Dextran sulfát (Sigma)

Anti-digoxigenin-fluorescein Fab Fragment (Roche)

FluoroLinkTMCyTM3 labelled streptavidin (Amersham)  
v případě amplifikace signálu: Fluorescein anti-sheep IgG (Vector Laboratories) nebo  
fluorescent antibody enhancer set for DIG detection (Roche); Biotinylated anti-streptavidin  
(Vector Laboratories)

### Seznam literatury:

- Fuchs J, Schubert I. Characterization of plant genomes using fluorescence in situ hybridization. *Plant Cytogenetics*. Katowice, 1998.
- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci* 63: 378-383, 1969.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-587, 1969.
- Heng HHQ and Tsui LC. High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent in situ hybridization. *J Chromat A* 806: 219-229, 1998.
- Koch JE, Kølva S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund L. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha-satellite DNA in situ. *Chromosoma* 98: 259, 1989
- Khrustaleva LI, Kik C. Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant J* 25: 699-707, 2001.
- Kubaláková, M., Macas, J., Doležel, J. Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. *Theor. Appl. Genet.* 94: 758, 1997.
- Lamb JC, Danilova T, Bauer MJ, Meyer JM, Holland JJ, Jensen MD, Birchler JA. Single-gene detection and karyotyping using small-target fluorescence in situ hybridization on maize somatic chromosomes. *Genetics* 175: 1047-1058, 2007.
- Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4381-4385, 1982.
- Lehfer, H, Bush, W, Martin, R, Herrman, RG. Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosoma* 102: 428-432, 1993.
- Macas J, Doležel J, Gualberti G, Pich U, Schubert I, Lucretti S. Primer-Induced Labeling of Pea and Field Bean Chromosomes In-Situ and in Suspension. *Biotechniques* 19: 402, 1995.
- Meinkoth J, Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138: 267-284, 1984.
- Pich U, Meister A, Macas J, Doležel J, Lucretti S, Schubert I. Primed in-situ labeling facilitates flow sorting of similar sized chromosomes. *Plant J* 7: 1039-1044, 1995.
- Raap AK, Florijn RJ, Blonden LAJ, Wiegant J, Vaandrager JW, Vrolijk H, den Dunnen J, Tanke HJ, van Ommen GJ. Fiber FISH as a DNA Mapping Tool. *Methods* 9: 67-73, 1996.
- Rayburn AL, Gill BS. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J. Heredity* 76: 78-81, 1985.
- Schwarzacher T and Heslo-Harrison P. Practical in situ hybridization, BIOS Scientific Publisher Limited, Oxford, pp.203, 2000.
- Valárik M, Bartoš J, Kovářová P, Kubaláková M, de Jong JH, Doležel J. High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *Plant J.* 37: 940-50, 2004.
- Wilkinson DG, ed. In situ Hybridization: A practical Approach. Oxford: IRL Press, 1992.
- Wilcox JN. Fundamental principles of in situ hybridization. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41 . 1725-1733, 1993.