

KỸ THUẬT LAI PHÂN TỬ (Nucleic acid)

NGUYEN LE THANH (MRES)

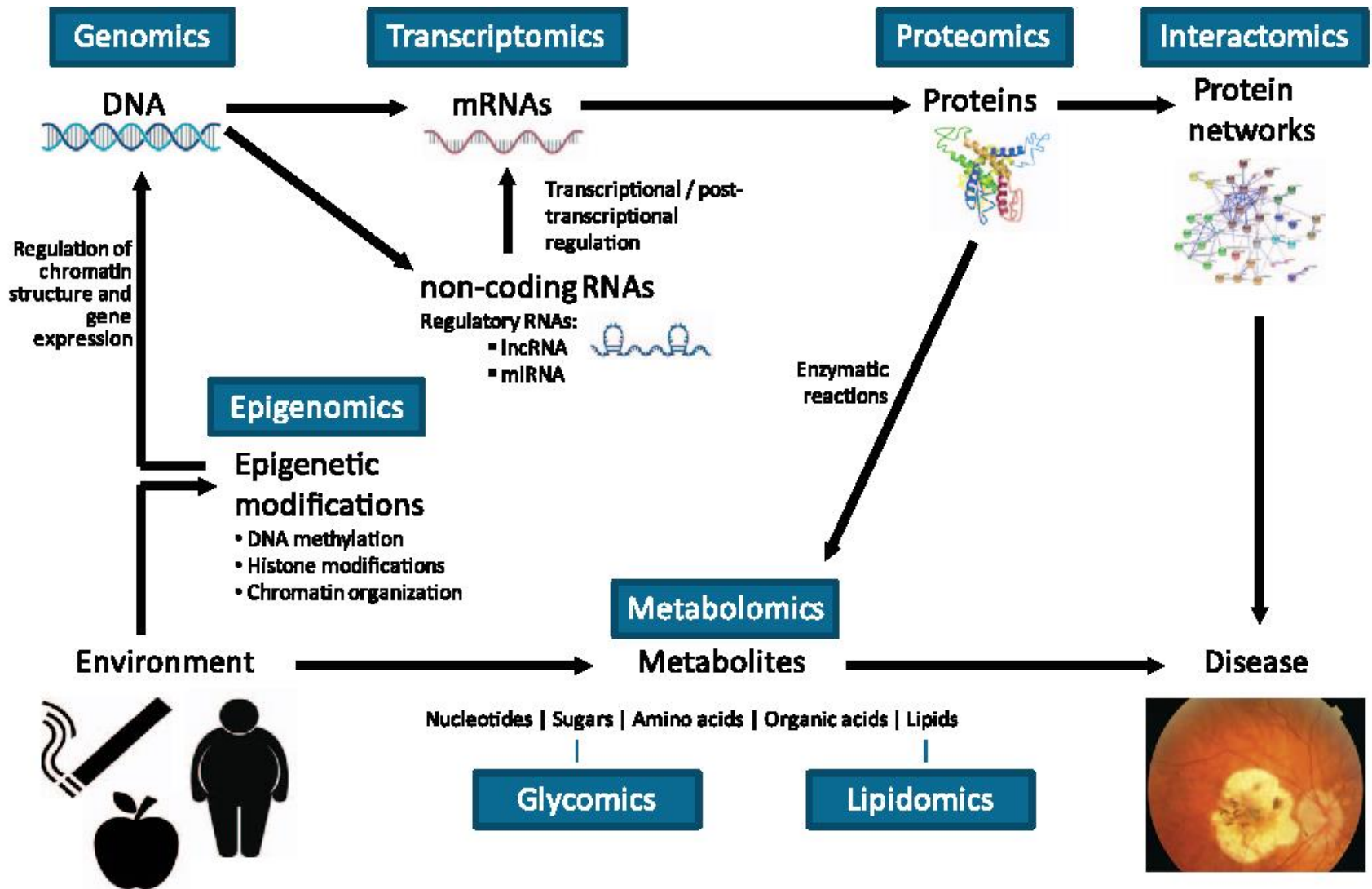
SUB-DEPARTMENT MEDICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

PHAM NGOC THACH MEDICAL UNIVERSITY



MỤC LỤC

1. Giới thiệu chung
2. Southern Blot
3. Northern Blot
4. ISH
5. F-ISH
6. C-ISH

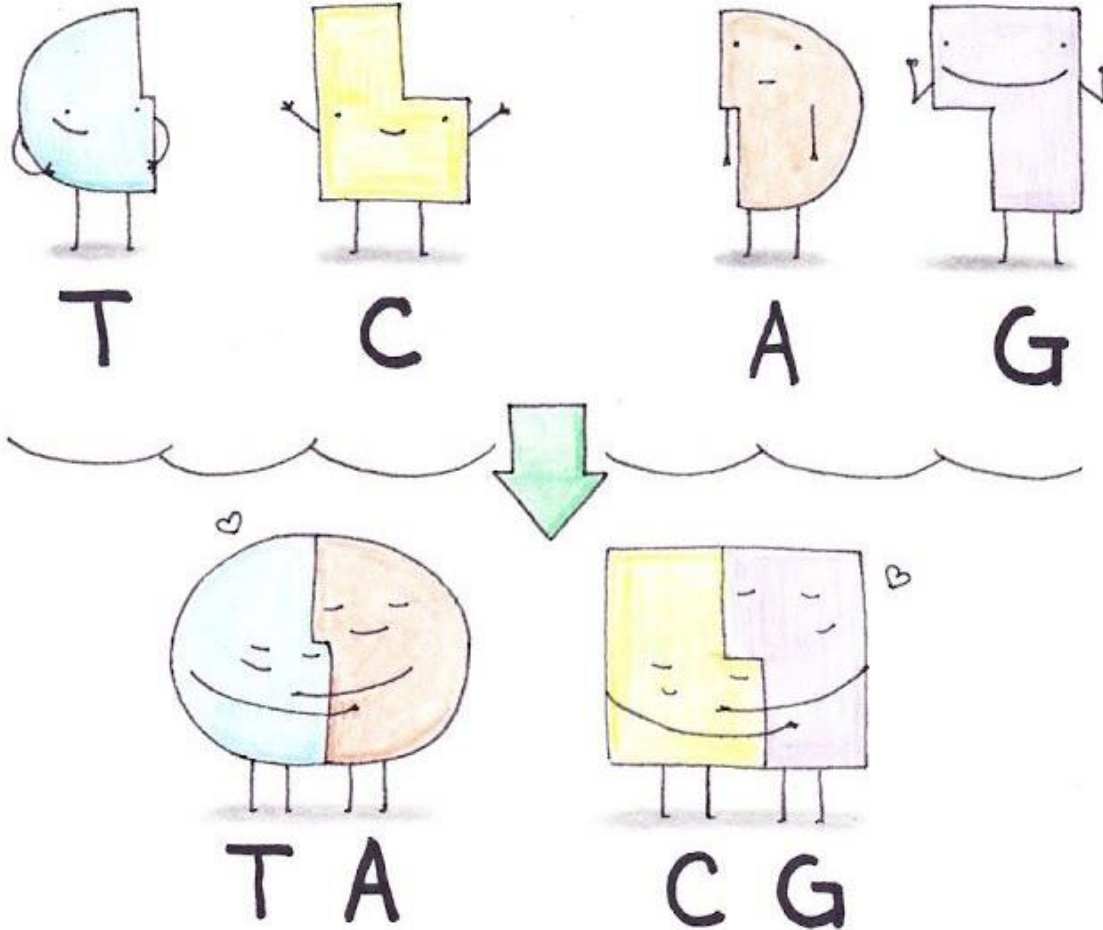
1. Giới thiệu chung



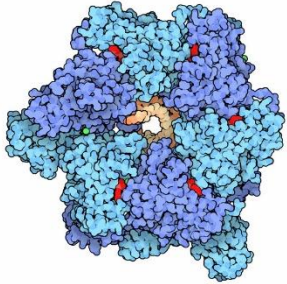
Recap

DNA (Deoxyribonucleic Acid)	RNA (Ribonucleic Acid)
 <p>Deoxyribose (sugar)</p> <p>Generally Double-stranded*</p> <p>*few exceptions</p>	 <p>Ribose (sugar)</p> <p>Generally Single-stranded*</p> <p>*few exceptions</p>
<ul style="list-style-type: none">● Adenine● Thymine● Cytosine● Guanine	<ul style="list-style-type: none">● Adenine● Uracil● Cytosine● Guanine

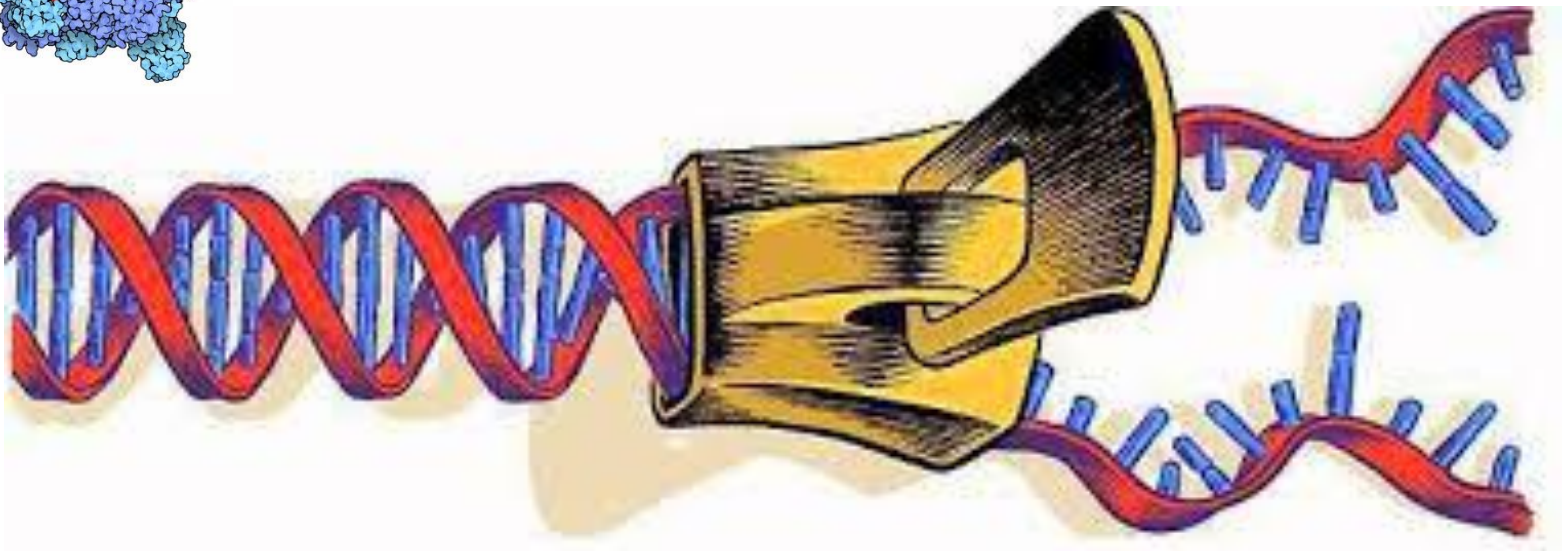
Recap



Recap



helicase



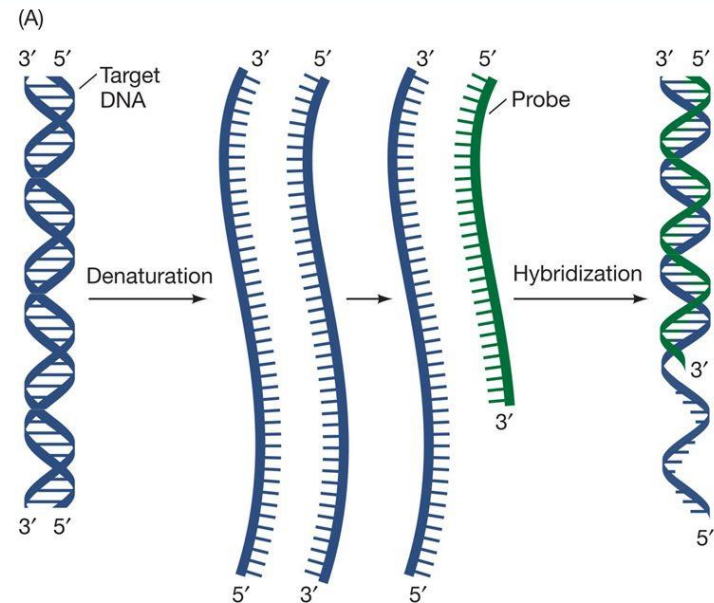
Nhiệt độ cao 90 -95 độ C
HOẶC hóa chất (alkaline)



Nucleic Acid Hybridization

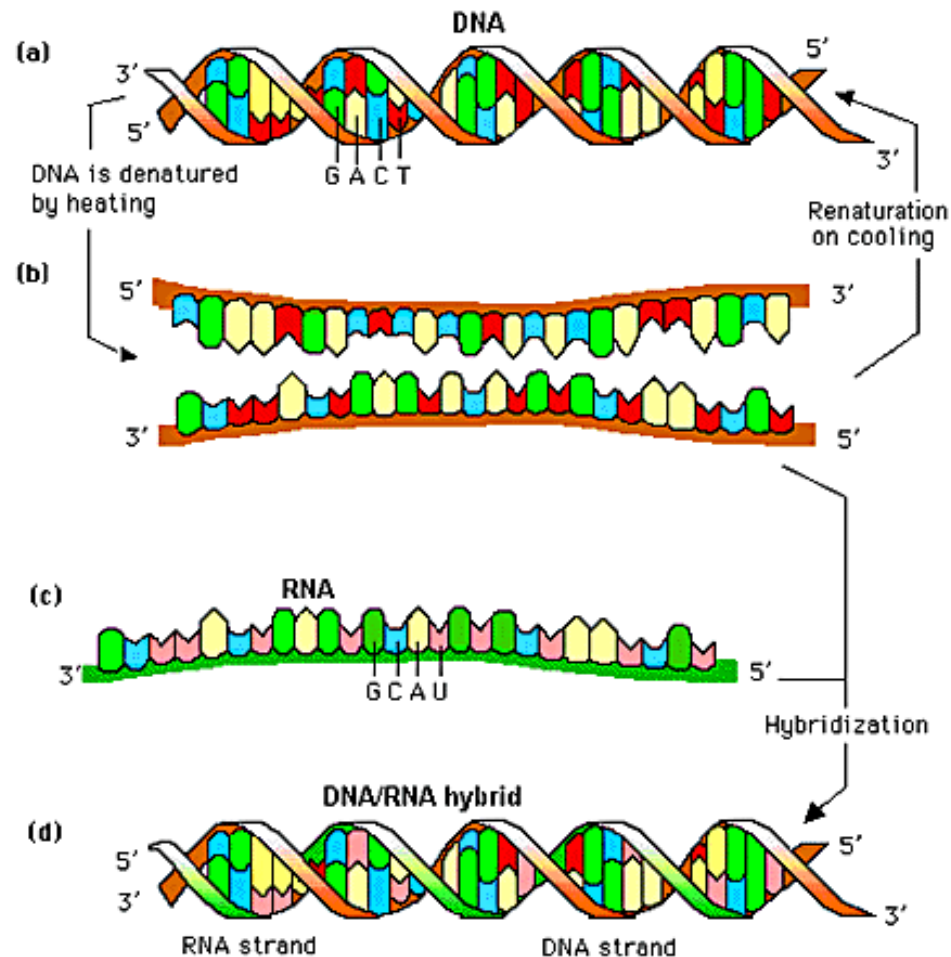
- Year introduced: 1971 – 1972
- What?
 - Exploits ability complementary sequences
 - Single stranded → pair → double helix
- Who? Target
 - 2 complimentary DNA sequences
 - 1 DNA and 1 RNA
 - 2 RNA sequences
- Use:
 - Detect and isolate specific sequences
 - Measure homology
 - Define characteristics

Figure 14.7 Nucleic Acid Hybridization and Introns (Part 1)



LIFE 10e, Figure 14.7 (Part 1)
© 2014 Sinauer Associates, Inc.

Nucleic Acid Hybridization



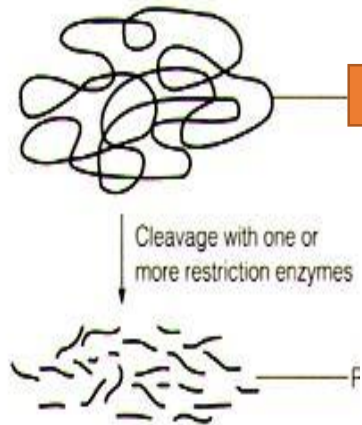
2. PP Southern Blotting

Khái niệm chung

- 1975: Edwin Southern
- Đặc điểm:
 - Định tính DNA trong mẫu
 - Biến tính DNA
 - Lai DNA-DNA
 - Màng lọc nitrocellulose
- Nguyên lý:
 - Biến tính và phân tách DNA theo kích thước
 - Chuyển các đoạn DNA phân tách bằng điện phân sang màng lọc
 - Phát hiện các mảnh DNA bằng pp thăm dò (đoạn dò DNA)



Quy trình



1

Cắt ADN với enzyme giới hạn thích hợp

2

AND biến tính trên gel (NaOH, Formadehyde)



Phân tách các đoạn ADN bằng phương pháp điện di trên gel agarose



Xác định trình tự đích gắn với mẫu dò bằng phương pháp thích hợp VD: X-ray film

6

3

Chuyển ADN từ gel lên màng



Ủ với mẫu dò (trong đệm)

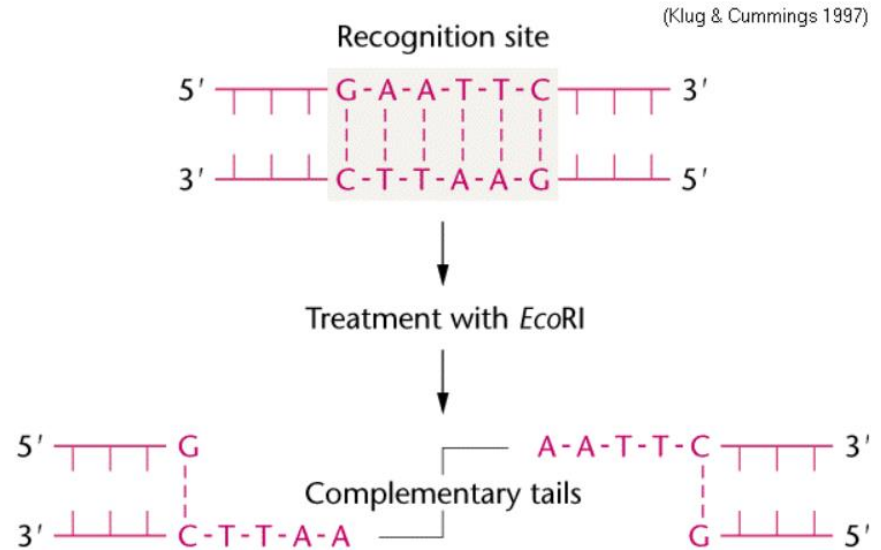
5

4

Các đoạn ADN trên màng

Restriction enzyme

- Enzyme cắt giới hạn (RE) / Endonuclease
- Nhận biết **đoạn trình tự nucleotide đặc hiệu** trên các phân tử DNA
- Cắt cả hai sợi DNA bổ sung tại các vị trí đặc thù.
- Câu hỏi:
 - Tại sao phải cắt DNA?
 - Tại sao phải cắt DNA tại một trình tự đặc hiệu biết trước?



Ứng dụng

- Xác định intron, exon, đột biến (thêm hoặc mất đoạn)
- Khi sử dụng các DNA marker khác nhau làm mẫu dò, có thể phân biệt được các loài, các loài đồng hình.
- Enzyme giới hạn (Restriction enzyme): giúp phát hiện sự đa dạng chiều dài các đoạn cắt bởi RE, qua đó, nhận biết sự sai biệt di truyền ở vị trí nhận biết của các RE dẫn đến sai biệt trong chiều dài của các đoạn DNA tạo ra từ RE đó.
- Chẩn đoán bệnh thai nhi (fragile X syndrome)
 - Nguyên nhân gây ra hội chứng Fragile X là do một khiếm khuyết trong gene FMR1, hiện diện trên nhiễm sắc thể X.
 - Khuếch đại của đoạn lặp CGG trong vùng 5' không dịch mã của FMR1 (OMIM *309550)
 - Khuyết tật về phát triển và trí tuệ
 - Di truyền thường gặp ở bé trai

Fragile X syndrome

A 15-year-long Southern blotting analysis of FMR1 to detect female carriers and for prenatal diagnosis of fragile X syndrome in Taiwan.

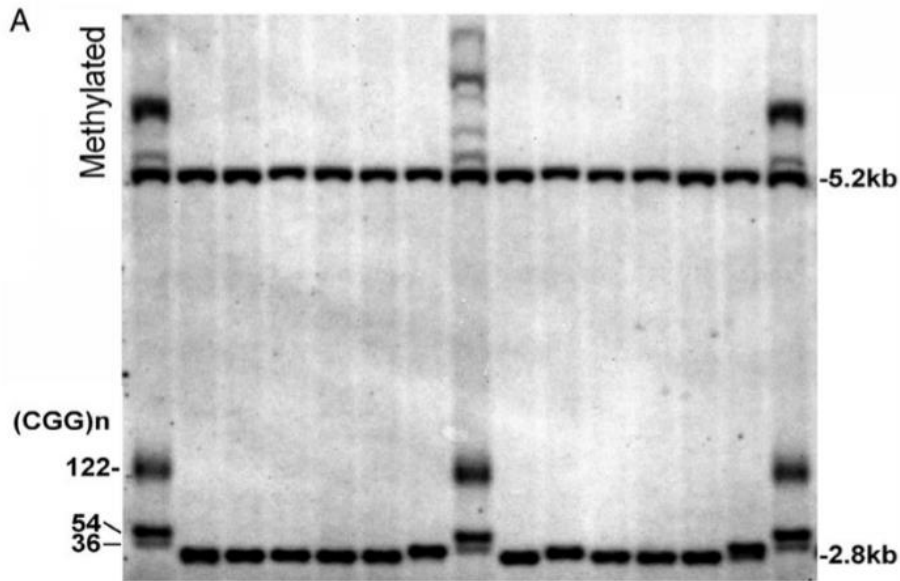
[Tzeng CC](#)¹, [Tsai LP](#)^{2,3}, [Chang YK](#)^{3,2}, [Hung YJ](#)⁴, [Chang YY](#)⁵, [Su YP](#)⁶, [Jiang JJ](#)⁷, [Liang HM](#)⁸.

Author information

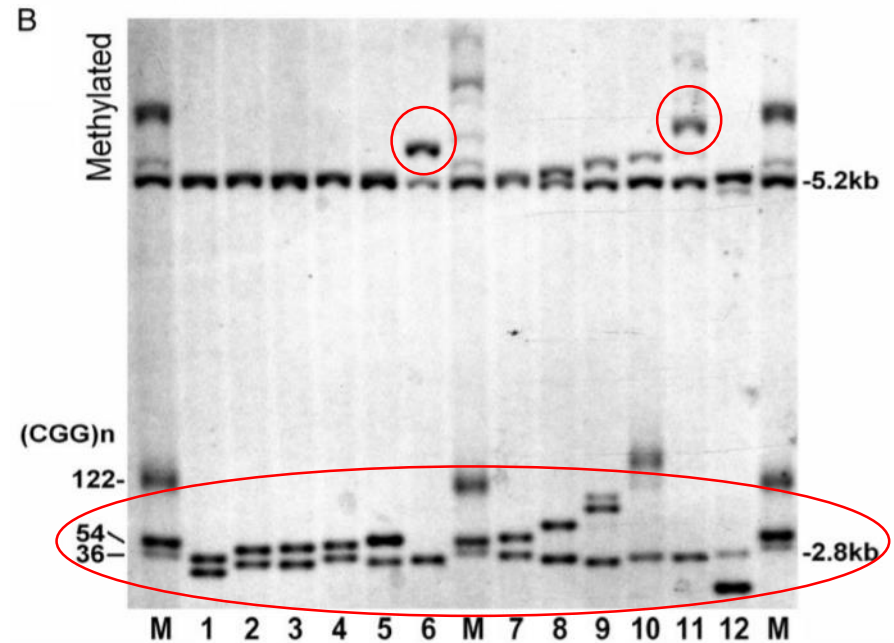
Abstract

Here, we review the results of Southern blotting analyses of the FMR1 gene performed in our reference laboratory in Taiwan over a 15-year period. In total, 725 high-risk women with a family history of fragile X syndrome (FXS) or idiopathic intellectual disability, 3911 low-risk pregnant women without such family history, and prenatal diagnosis data for 32 fetuses from 24 carrier mothers were included. Only 2 carriers were in the low-risk group, which indicated a prevalence of 1 of 1955 women (95% confidence interval: 1/7156-1/539). A total of 100 carriers were found to be in the high-risk group, thus revealing a significantly higher frequency than the low-risk group (100/725 vs 2/3911, $P < 0.0001$). Eight of the 14 fetuses that inherited the maternal mutant allele were verified to have a full mutation, with the smallest maternal pre-mutation allele carrying 56 CGG repeats. The overall findings confirmed that the carrier prevalence among low-risk women in Taiwan is significantly lower than that reported in western countries. Therefore, the most important step for preventing FXS in Taiwan would be to focus on high-risk women by promoting general awareness of this disease and spreading knowledge regarding the benefits of carrier screening and prenatal testing.

Fragile X syndrome



Normal
< 30



Mutation
> = 30

3. PP Northern Blotting

Khái niệm chung

- 1977: James Alwine, David Kemp, and George Stark at Stanford University
- Đặc điểm:
 - Định tính RNA trong mẫu
 - Tách RNA
 - Lai RNA-DNA
 - Màng lọc nitrocellulose, amino benzoxymethyl
- Nguyên lý:
 - RNA phân tích theo kích thước → điện di
 - Biến tính: (i) ngăn cản sự hình thành cấu trúc bậc hai của RNA (ii) không cản trở sự di chuyển cũng như sự tách của các RNA trên gel
 - Mẫu dò DNA có đánh dấu phóng xạ lai với RNA đích
 - Xác định được biểu hiện gen



Primary structure

5' AUGCGGCUACGUAACGAGCCUUAAGCGCGUAUACCGAAAGGGUAGAAC 3'

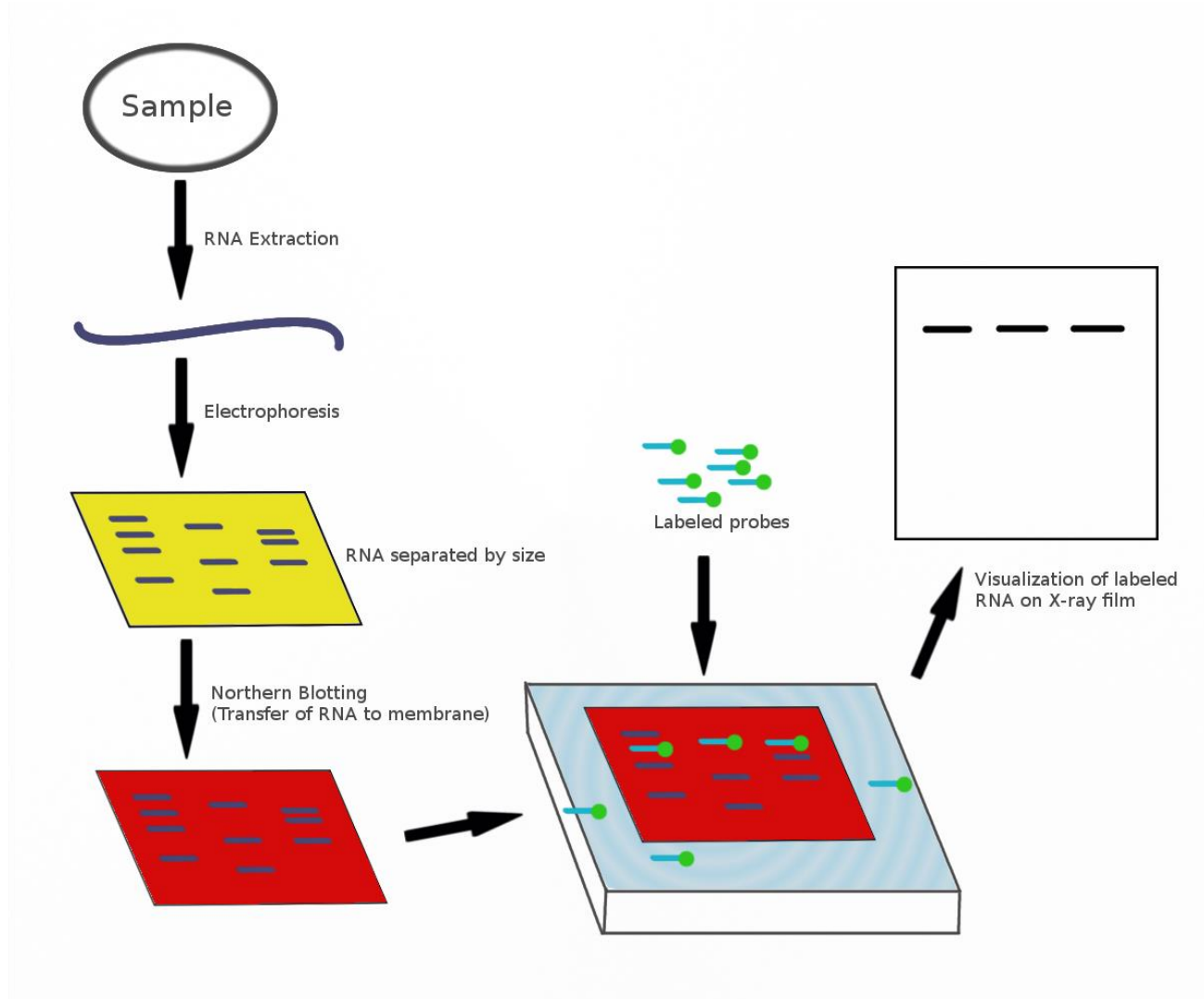
Folding

Secondary structure



Quy trình

Video tham khảo: <https://youtu.be/1ocmeyP6gml>



Ứng dụng

- Sử dụng
 - Phát hiện sự có mặt mRNA trong các mẫu khác nhau
 - Phân tích sự biểu hiện của gen giữa hai mẫu
 - Phát hiện virus RNA
- Ưu điểm
 - Đơn giản
 - Có thể lưu trữ lâu dài
- Nhược điểm
 - Độ nhạy thấp so với những KT khác như Real-time PCR, microarray
 - Dễ bị ảnh hưởng Rnase
 - Phát hiện được ít gene

Câu hỏi

- So sánh Southern và Northern Blotting
- Với những tiến bộ trong công nghệ ngày nay, những KT như vậy còn chỗ đứng?

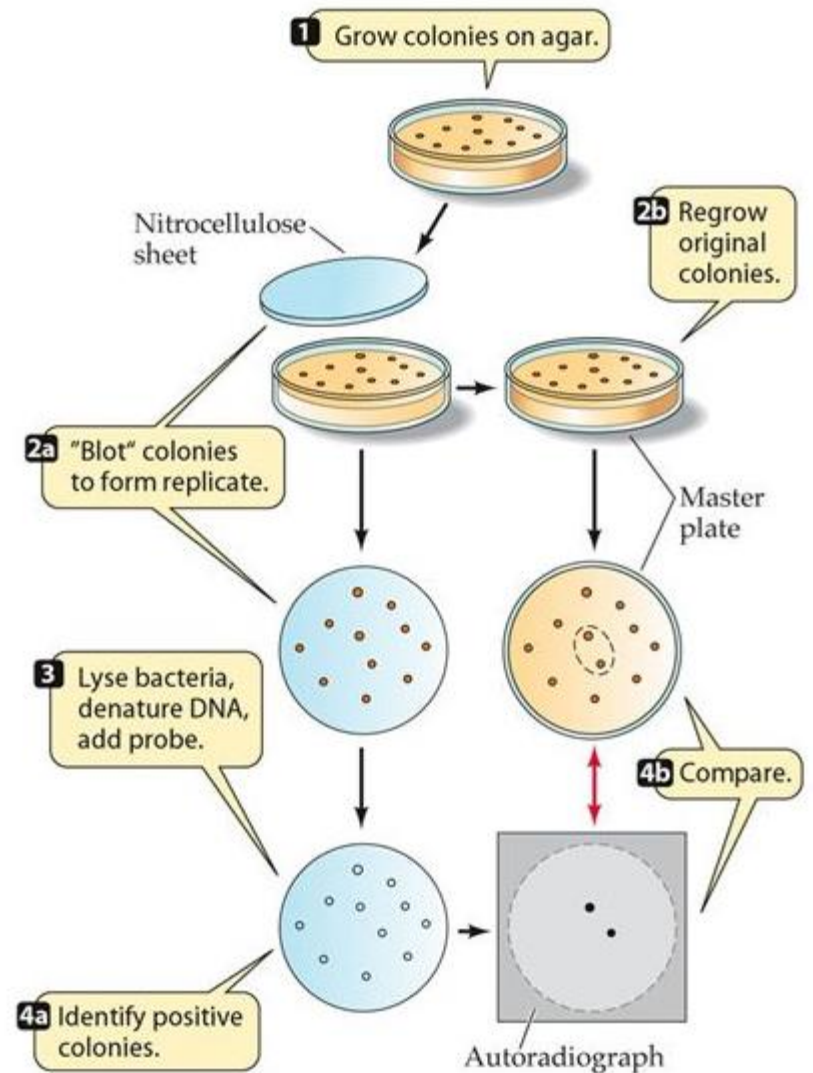


4. PP Lai phân tử tại chỗ

In-situ hybridization (ISH)

Khái niệm chung

- Không cần tách chiết
- Trình tự nucleic acid (DNA/RNA) trong tế bào, mô
- Một vài ứng dụng:
 - Lai trên khuẩn lạc
 - Lai trên NST
 - Lai trên tế bào và mô



Phạm vi sử dụng

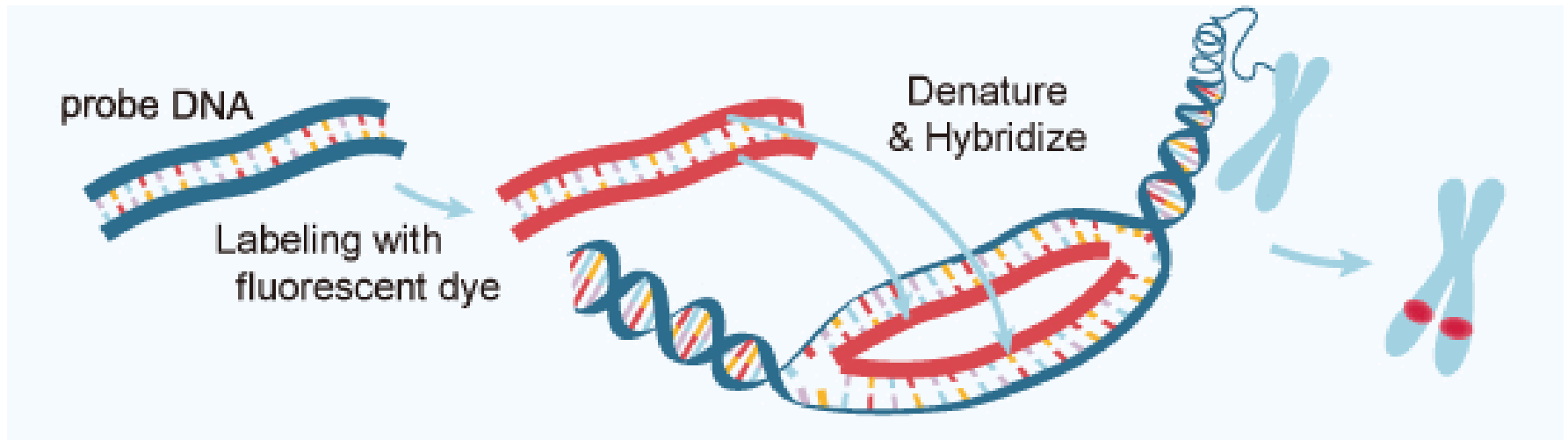
- Đối tượng nghiên cứu:
 - Phức tạp, nhiều tế bào khác nhau
- Phối hợp phát hiện mRNA và protein → phiên mã và dịch mã
- Tương tác của các nucleic acid khác nhau:
 - Giúp hiểu cấu trúc sắp xếp, quá trình điều hòa và chức năng của các gen

5. FISH – Lai phân tử huỳnh quang tại chỗ

Fluorescence In-situ hybridization (F-ISH)

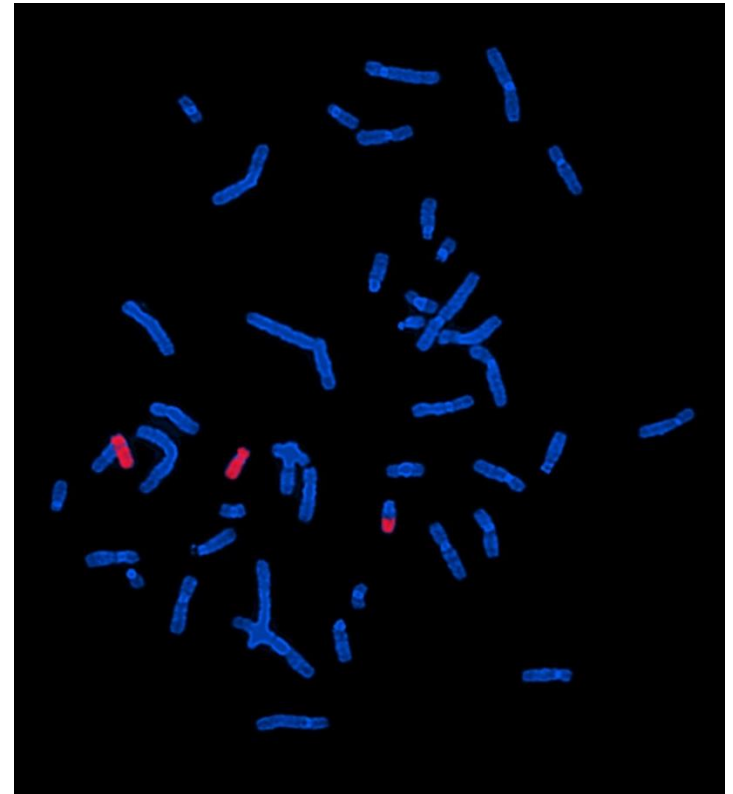
Khái niệm chung

- Đặc điểm:
 - Đầu dò huỳnh quang (probe), Trình tự bổ sung trên NST, Xác định trình tự DNA đặc trưng trên NST
 - Xem xét chu trình nhân lên của tế bào, đặc biệt ở pha trung gian của nhân tế bào để tìm các bất thường trong nhiễm sắc thể
- Ứng dụng:
 - Tư vấn di truyền
 - Phát hiện và xác định vị trí các RNA đích đặc hiệu (mRNA, microRNAs) bên trong tế bào, tế bào khối u tuần hoàn di căn và các mẫu mô.
 - Xác định sự biểu hiện gene (trong tế bào và mô nhất định ở những khoảng thời gian khác nhau trong quá trình phát triển)



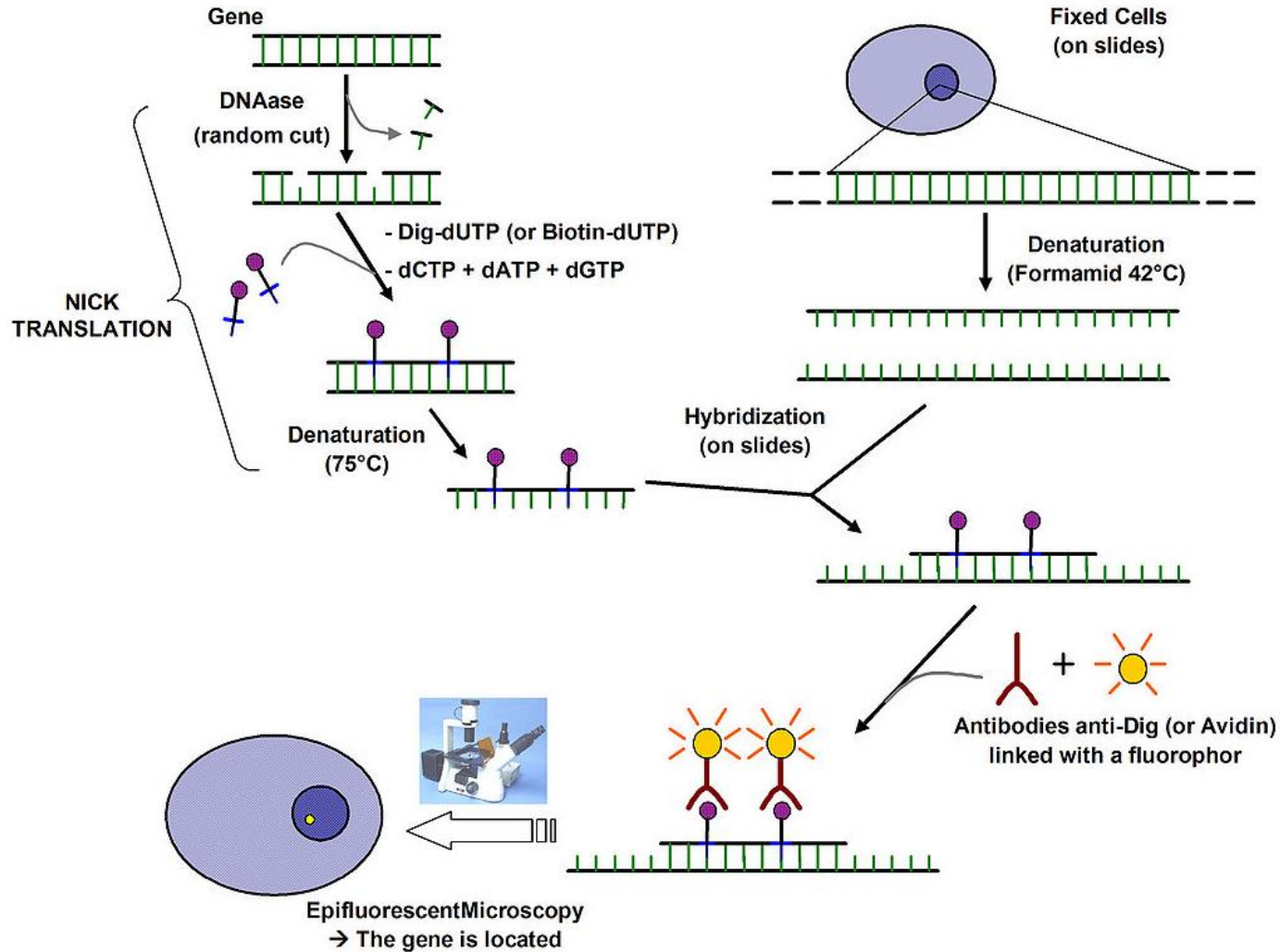
Khái niệm chung

- Ưu điểm:
 - Đột biến mất đoạn nhỏ
 - Phát hiện biến dạng di truyền sớm
 - Thời gian ngắn (vài ngày), không cần nuôi cấy
 - Nhiều hơn 1 gene đích
- Khuyết điểm:
 - Giới hạn phát hiện cao
 - Đầu dò huỳnh quang phải được thiết kế
 - Không kinh tế
 - Tay nghề cao



Quy trình

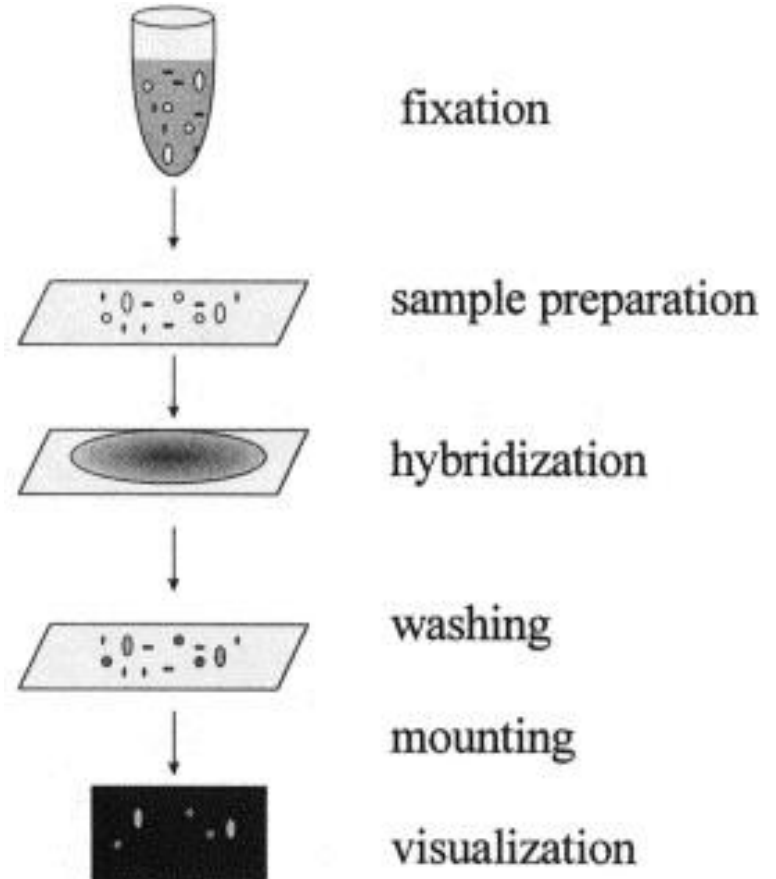
Video tham khảo: <https://youtu.be/b81DcJC1jAs>



Quy trình

- Phương pháp thực hiện:

- Chuẩn bị mẫu và đầu dò
- Cố định mẫu
- Lai giữa đầu dò và trình tự đích đặc hiệu trong tế bào
- Rửa mẫu để loại bỏ các đầu dò không được lai
- Dò tìm mẫu
- Quan sát, hiển thị và lưu trữ kết quả



Đoạn dò (probe)

- **Probe chuyên biệt**

- Gắn với một vùng chuyên biệt của NST
- Sử dụng khi tách một vùng gen, xác định NST nào mà gen định vị

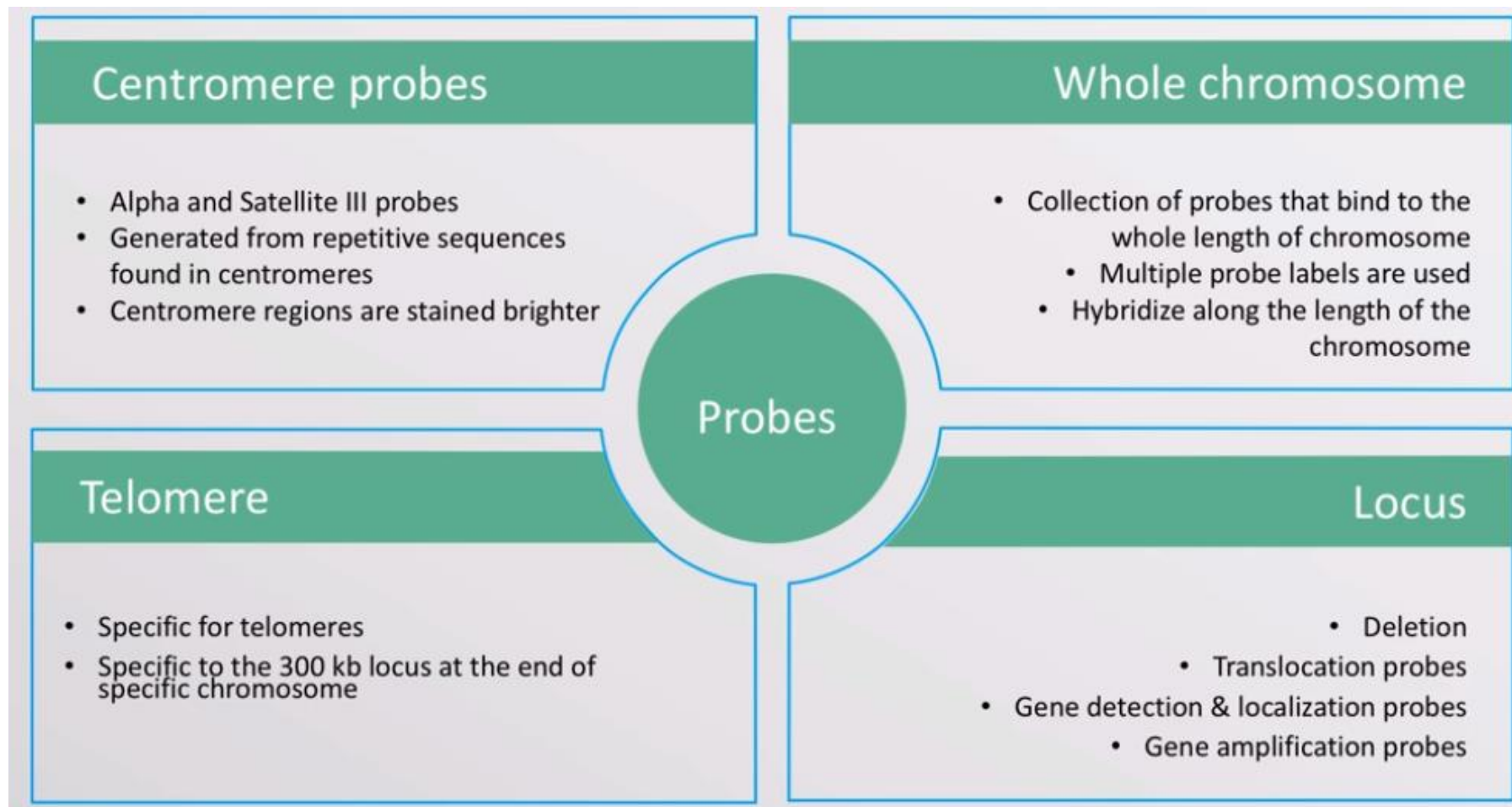
- **Probe cả nhiễm sắc thể**

- Tập hợp gồm các mẫu dò nhỏ hơn, mỗi cái gắn vào trình tự khác nhau dọc theo NST
- Sử dụng để kiểm tra sự bất thường của NST

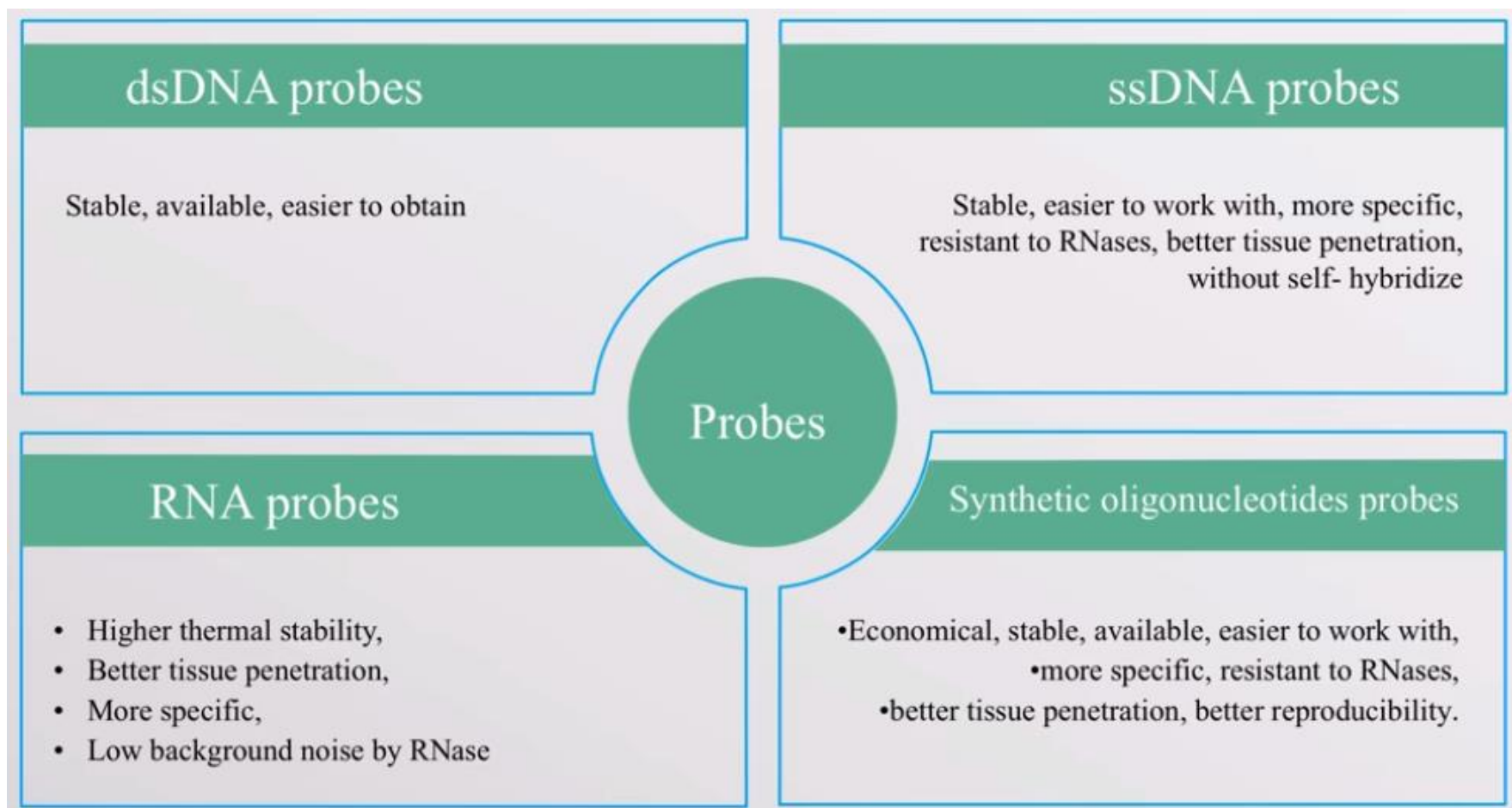
- **Probe Lặp lại trung thể**

- Tạo ra từ các vùng có trình tự lặp đi lặp lại có trên vùng giữa của mỗi NST.
- Sử dụng để xác định cá thể nào mang vật liệu di truyền từ một NST chuyên biệt nào đó

Đoạn dò (probe)



Đoạn dò (probe)

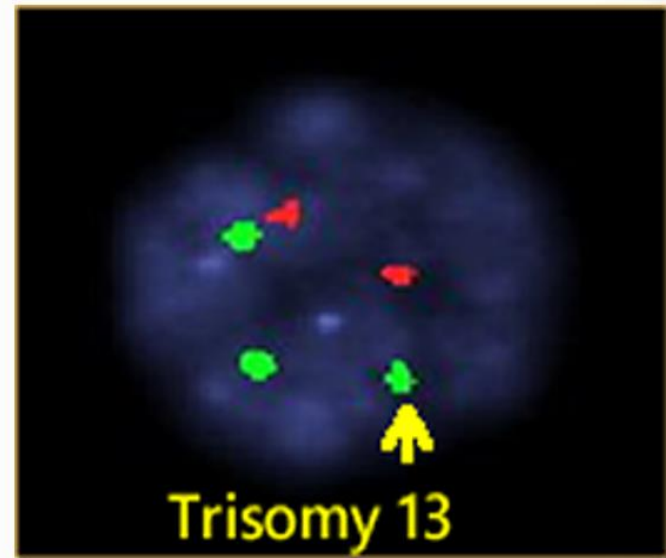
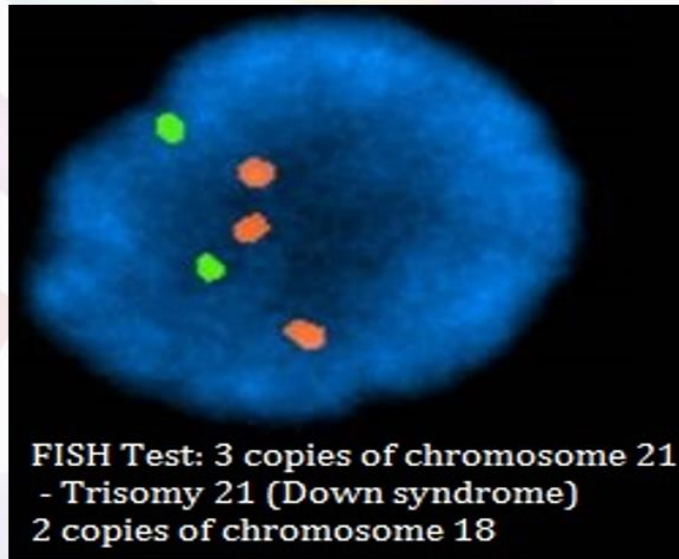


FISH

- Kỹ thuật FISH được chỉ định trong các trường hợp sau:
 - Chẩn đoán trước sinh các bất thường số lượng NST ở thai nhi.
 - Phát hiện các mất đoạn nhỏ ở một số hội chứng di truyền.
 - Xác định các đoạn nhiễm sắc thể chưa rõ nguồn gốc.
 - Phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể đặc hiệu trong ung thư.

FISH – Chẩn đoán trước sinh

- *Chẩn đoán trước sinh các bất thường số lượng NST ở thai nhi.*

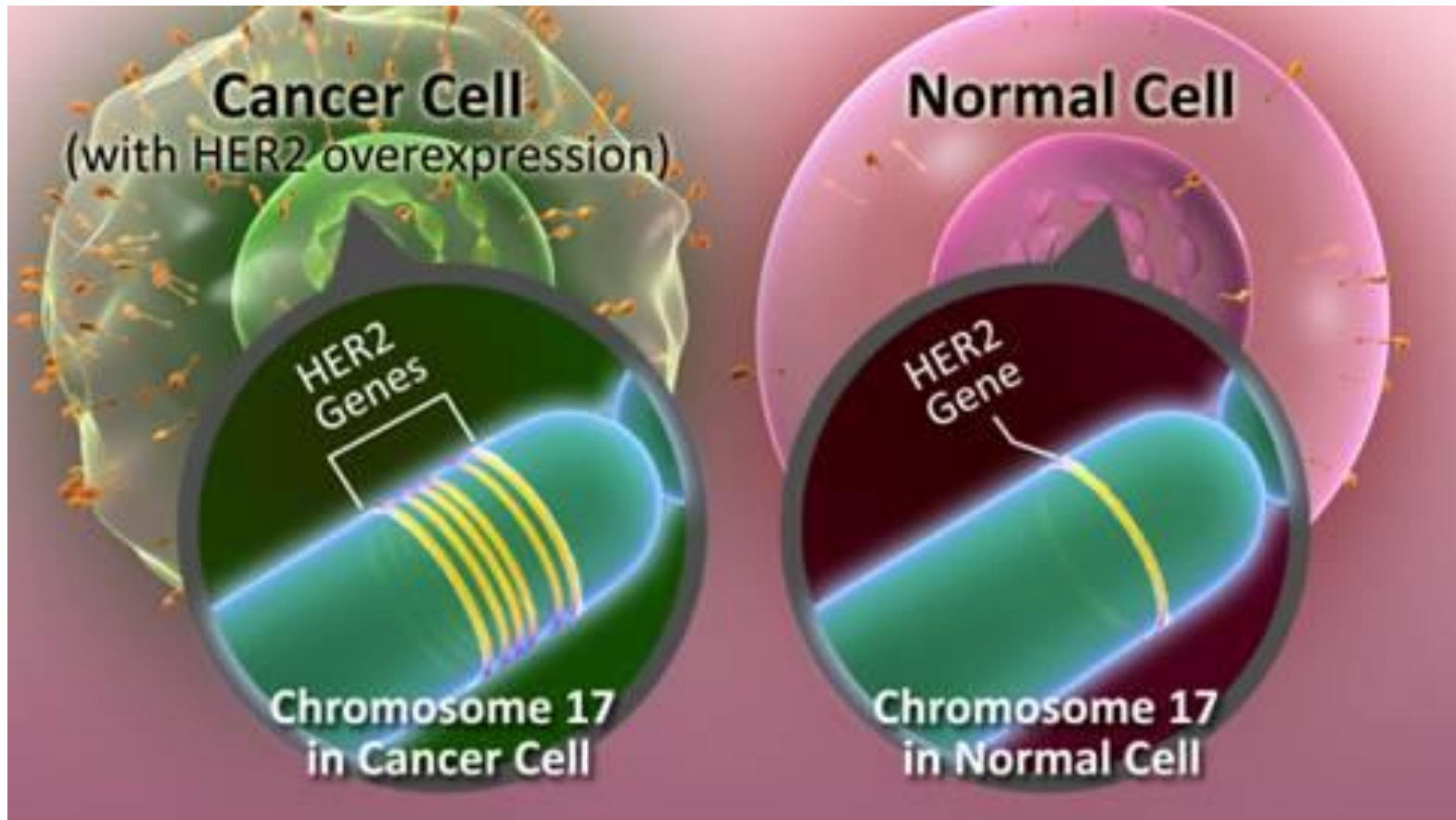


FISH có thể dùng để sàng lọc một số hội chứng di truyền thường gặp như hội chứng Down (*trisomy 21*), hội chứng Patau (*trisomy 13*), hội chứng Edward (*trisomy 18*), hội chứng Turner (*monosomy X*), hội chứng Klinefelter (*XXY*)

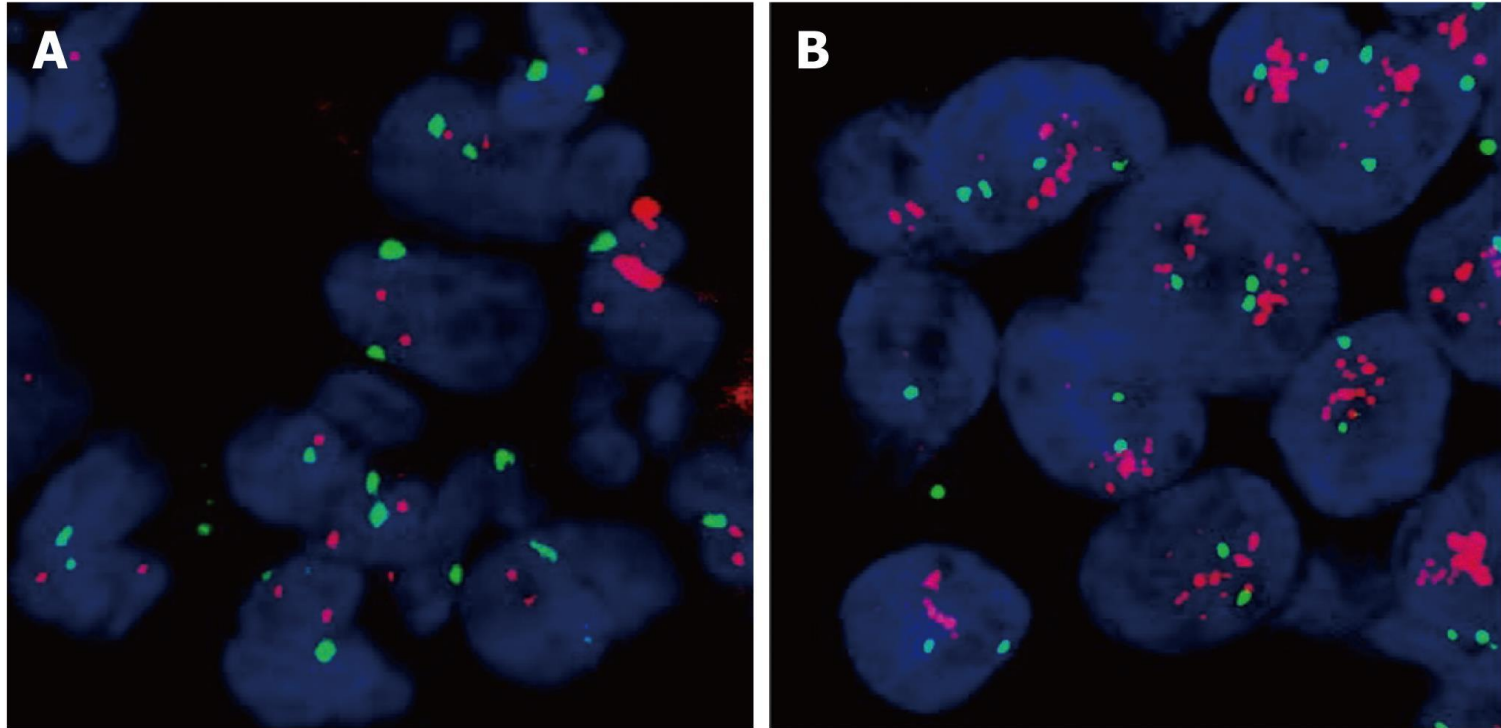
FISH – Chẩn đoán ung thư vú HER2

- ASCO/CAP guidelines, HER2 testing
 - immunohistochemical → HER2 protein
 - HER2 gene: fluorescence in situ hybridization (FISH)
 - HER2 gene: chromogenic in situ hybridization (CISH)
- FISH: tiêu chuẩn vàng
 - Ung thư vú giai đoạn đầu

FISH – Chẩn đoán ung thư vú HER2



FISH – Chẩn đoán ung thư vú HER2



- (1) Đoạn dò PathVysion DNA Spectrum Orange-đặc hiệu cho gen HER2
- (2) Đoạn dò Spectrum Green đặc hiệu cho các trình tự DNA tại tâm động của nhiễm sắc thể 17 (CEP17).

FISH – Chẩn đoán ung thư vú HER2

- XN FISH: Dual color, tỷ lệ > 2.2 → khuếch đại HER2
 - XN FISH: Single color → 6/nucleus → khuếch đại HER2
- Polysomy 17
- Gây nhiễu kết quả XN

Impact of polysomy 17 on HER2 testing of invasive breast cancer patients

[Yang Liu](#),^{1,*} [Li Ma](#),^{2,*} [Dequan Liu](#),¹ [Zhibing Yang](#),¹ [Chengang Yang](#),³ [Zaoxiu Hu](#),³ [Wenlin Chen](#),¹ [Zhuangqing Yang](#),¹ [Sijun Chen](#),¹ [Zhuoni Zhang](#)¹

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶ [Disclaimer](#)

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

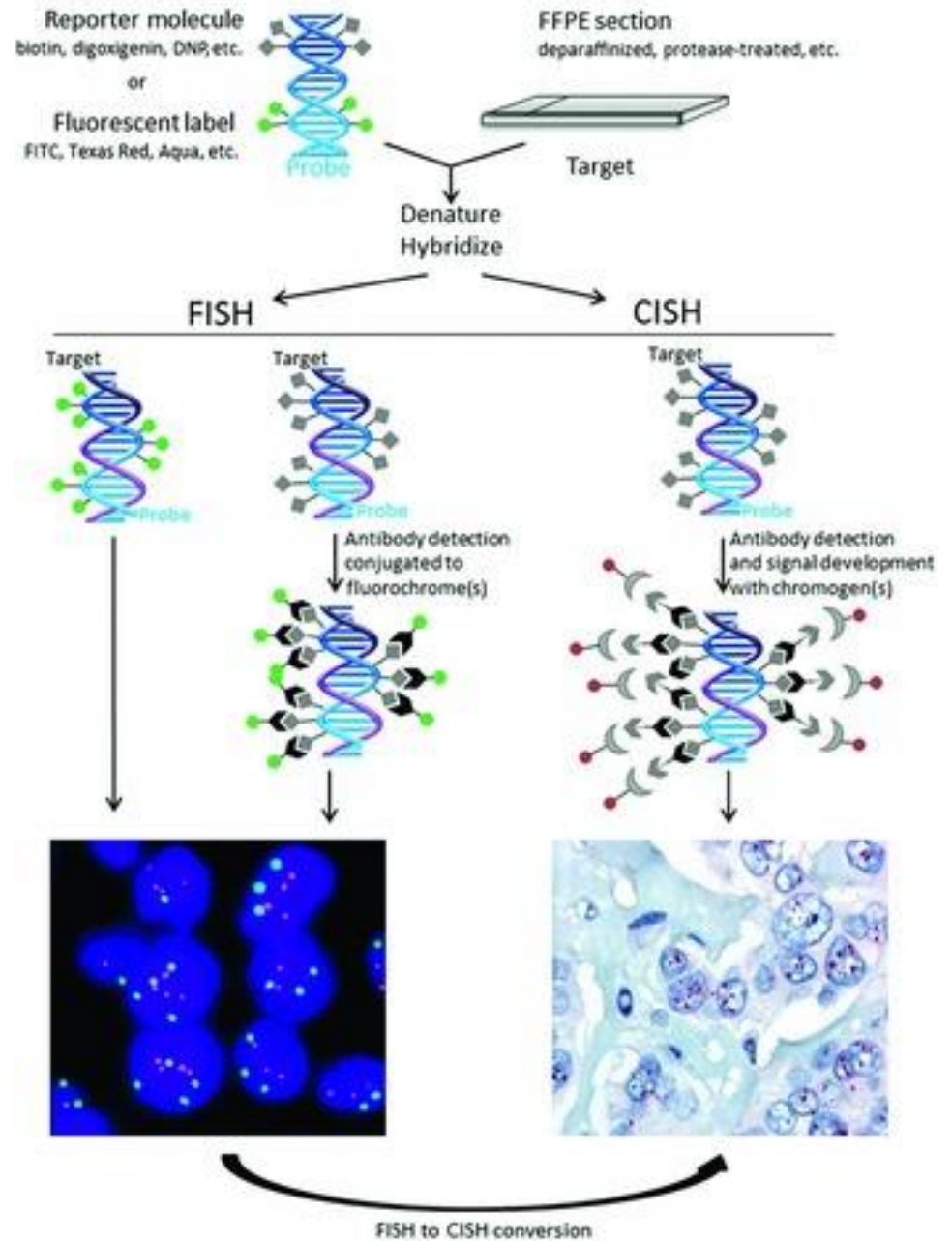
Abstract

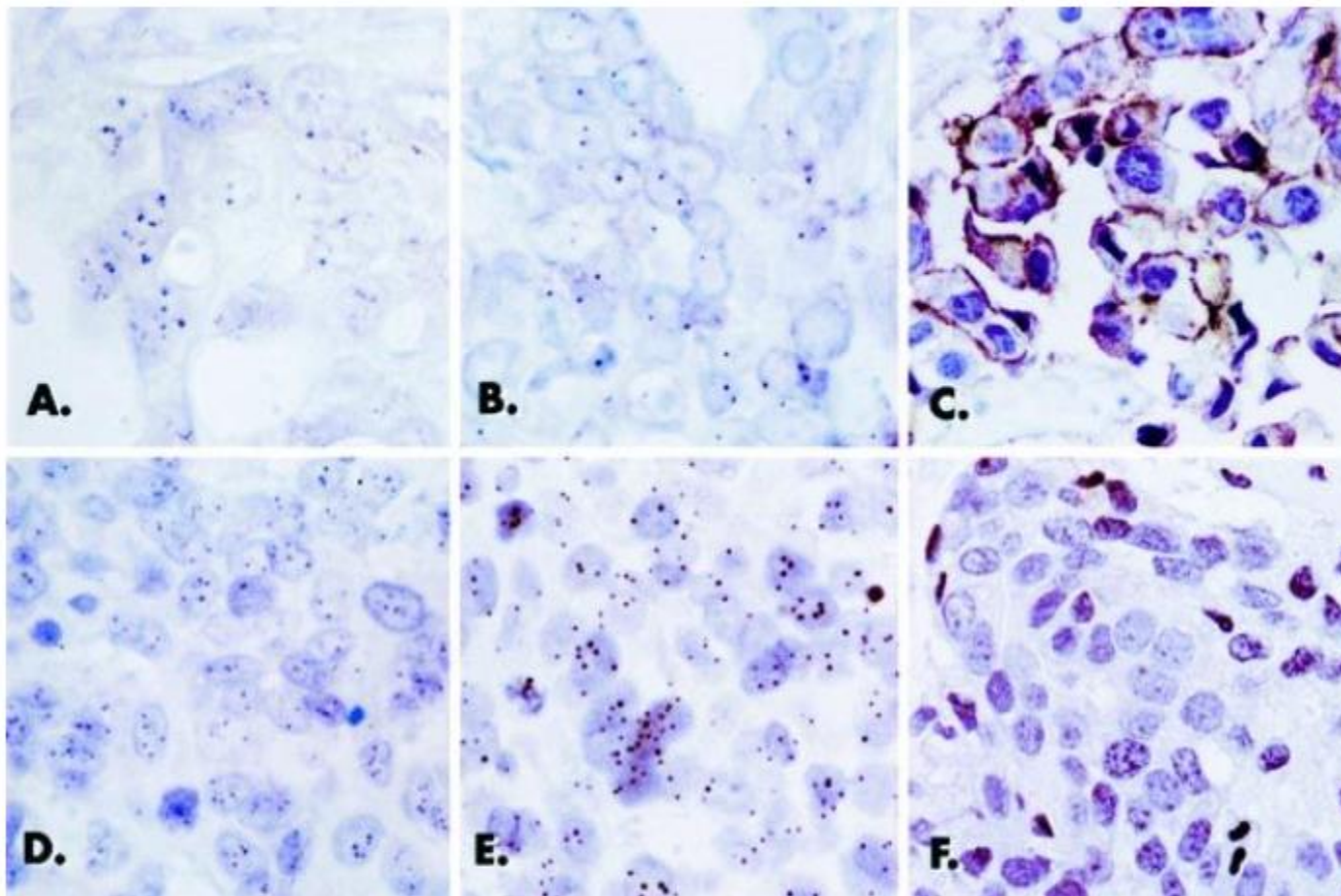
Go to: 

Background: Current American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines define HER2-positive tumors as those with > 6 HER2 genes per nucleus or those with HER2/CEP17 (chromosome 17) ratio > 2.2 . These guidelines are potentially contradictory in tumors with polysomy of chromosome 17. The current study was performed to determine the impact of polysomy 17 on the interpretation of HER2 testing of invasive breast carcinomas. **Methods:** Chromosome 17 copies and HER2

6. CISH - Chromogenic in situ hybridization

FISH vs CISH





HER2 and Chr.17cen CISH, and HER2 IHC staining in breast carcinomas. CISH of HER2 gene low amplification appears as 6 to 10 gene copies per nucleus (A), CISH using Chr.17cen probe showing diploid of chromosome 17 as two dots per nucleus (B), and IHC of TAB250 2+ staining (C); CISH of HER2 appears as three to five copies per nucleus (D), CISH using Chr.17cen probe showing polysomy of chromosome 17 as three to five dots per nucleus (E), and IHC of TAB250 0 staining (F). Original magnification, 400 ×. Counterstained with hematoxylin.

Câu hỏi

- Probe DNA/RNA?
- Những yếu tố nào ảnh hưởng đến kết quả chính xác của một test FISH?
- Những điều kiện nào khiến kết quả của một FISH test không dùng được?
- Các thành phần cần thiết cho một thí nghiệm sử dụng kỹ thuật lai phân tử?
- KT Lai phân tử có thể dùng để nghiên cứu những đột biến trên gen, đúng hay sai?
- KT Lai phân tử dùng để chẩn đoán những bệnh nào?



THANK YOU

Any question?

