Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FiSH)

J. Arnemann

Abteilung Molekulargenetik, Labor Dr. Wisplinghoff, Köln, Deutschland

Synonym(e) DNA- oder RNA-Nachweis mittels fluoreszenzmarkierter Sonden

Englischer Begriff fluorescence in-situ hybridization

Definition Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FiSH) ist eine Methode zum Nachweis und zur Charakterisierung von mRNA- und DNA-Molekülen in situ, nämlich in Geweben, in Zellen oder auf Chromosomen mittels fluoreszenzmarkierter DNA- oder RNA-Sonden.

Beschreibung Die eingesetzten DNA-Sonden werden i. d. R. aus klonierten und sequenzspezifischen DNA-Abschnitten durch direkte Markierung mittels Nicktranslation oder PCR unter Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Nukleotids oder durch indirekte Markierung unter Einbau eines biotin- oder digoxigeninmarkierten Nukleotids erstellt. Bei den indirekt markierten Sonden wird zur Detektion ein fluoreszenzmarkiertes Konjugat (Biotin-Streptavidin + Fluoreszenzfarbstoff) oder ein fluoreszenzmarkierter Antikörper (Digoxigenin-anti-Digoxigenin + Fluoreszenzfarbstoff) eingesetzt. Die RNA-Sonden werden durch reverse Transkription der Plasmide mittels T3-, T7- oder SP-Polymerase

unter direktem Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Nukleotids oder indirekt unter Einbau von biotin- oder digoxigeninmarkierten Nukleotiden generiert, wobei der Nachweis wie bei den indirekt markierten DNA-Sonden abläuft.

Vom Prinzip werden die vorbereiteten Objektträger mit den ausgestrichenen Zellen oder den vorbehandelten FFPE-Gewebeschnitten (FFPE = „formaldehyde-fixed paraffin-embedded“) für eine DNA-Hybridisierung zunächst denaturiert, um die Interphase-DNA einzelsträngig vorliegen zu haben, was bei RNA-Sonden entfällt. Anschließend werden die Präparate mit einer zugegebenen einzelsträngigen fluoreszenzmarkierten oder indirekt markierten Hybridisierungssonde über mehrere Stunden inkubiert (hybridisiert). Nach abgeschlossener Hybridisierung erfolgen mehrere Waschungen der Objektträger mit unterschiedlicher Stringenz und die anschließende Einbettung mit Deckgläschen. Bei einer indirekten Markierung erfolgt vorher noch eine Inkubation mit dem Konjugat bzw. Antikörper. Eine Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop. Während die Hybridisierung der DNA als Ergebnis immer eine Aussage zu Vorhandensein oder Abwesenheit der durch die DNA-Sonde definierten DNA-Abschnitte im Zellkern ergibt, vermag die RNA-Hybridisierung mit RNA-Sonden am Gewebe nicht nur semiquantitativ die Expression des Gens, sondern auch die gewebespezifische Verteilung darzustellen.

Literatur

Alberts et al (2002) Molecular biology of the cell, 4. Aufl. Garland Science, New York