

ПРИМЕНЕНИЕ TSA-FISH В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКЕ

Чаще всего метод TSA используют для визуализации сигналов ДНК-зондов, размер которых находится в пределах 1–2 т. п. н. Очевидно, что использование для таких целей коммерческих ДНК-зондов затруднено в связи с размером и с конкретной геномной локализацией ДНК-зонда. В таком случае необходимо использование несерийных локус-специфических ДНК-зондов с TSA, поскольку сигнал может быть сопоставим с сигналом, получаемым при детекции CNV с помощью коммерческих ДНК-зондов. Так, например, картировали два гена АТФ-связывающей кассеты (ABC) человека с использованием системы TSA-FISH и биотинилированных ДНК-зондов (Schriml et al., 1999). В этой работе было показано, что при обычной FISH не удалось обнаружить сигнал, в то время как TSA-FISH приводила к яркому усиленному сигналу (Schriml et al., 1999). В другой работе предположили использование TSA при идентификации гомологичных участков хромосом растений. Было произведено картирование путем TSA-FISH 12S-глобулина на метафазных пластинках диплоидных и полиплоидных организмов с целью установления родства между хромосомами, несущими сигналы гибридизации (Fominaya et al., 2016). Позднее сверхчувствительная FISH с усилением тирамидного сигнала позволила визуализировать мультигенное семейство аллииназ у филогенетически близких и отдаленных видов (Khrustaleva et al., 2019). Метод TSA-FISH был применен для исследования плоидности красной водоросли *Gracilariopsis lemaneiformis* (Chen et al., 2020). Несмотря на то, что большинство данных по TSA-FISH получены на различных биологических объектах (растениях, бактериях), эти результаты вполне могут быть экстраполированы на диагностические исследования у человека (Bagheri et al., 2017; Khrustaleva et al., 2019).

Таким образом, применение технологии усиления сигнала с использованием тирамида имеет большое практическое значение. Полученные знания о локализации ДНК-последовательностей на хромосоме позволяют проводить диагностику конститутивных хромосомных аномалий при использовании метода FISH. Перспективной областью применения гибридизации ДНК *in situ* с последующим усилением сигнала тирамидом является идентификация субмикроскопических CNV, поскольку их обнаружение ограничено размером коммерческих ДНК-зондов. В зависимости от использованного модифицированного нуклеотида в составе ДНК-зонда, возможно еще большее усиление сигнала за счет повышенной локальной концентрации флуоресцентной или хромогенной метки в исследуемых образцах в случаях непрямого детекции взаимодействия зонда с ДНК-мишенью.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств в рамках темы НИР № 122032300370-1 “Изучение структурно-функциональных особенностей и механизмов формирования хромосомных аномалий и геномного дисбаланса”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторами не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атякшин Д.А., Костин А.А., Шишкина В.В., Бухвалов И.Б., Тиманн М. 2022. Особенности распределения фермента CD38 в триптаза-позитивных тучных клетках: цитофизиологические и гистотопографические аспекты. Журнал анатомии и гистопатологии. Т. 11. № 1. С. 9. (Arjakshin D.A., Kostin A.A., Shishkina V.V., Buhvalov I.B., Timann M. 2022. Features of CD38 enzyme distribution in tryptase-positive mast cells: cytophysiological and histotopographic aspects. J. Anat. Histopathol. V. 11. № 1. P. 9.)
- Ведяйкин А.Д., Ходорковский М.А., Вишняков И.Е. 2019. Методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения и их использование для визуализации различных клеточных структур. Цитология. Т. 61. № 5. С. 343. (Vedyaykin A.D., Khodorkovskii M.A., Vishnyakov I.E. 2019. Super-resolution microscopy methods and their use for visualization of various cell structures. Tsitologiya. V. 61. № 5. P. 343.)
- Жигалина Д.И., Скрябин Н.А., Васильева О.Ю., Лопаткина М.Е., Васильев С.А., Сивоха В.М., Беляева Е.О., Савченко Р.Р., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. 2020. FISH-диагностика хромосомной транслокации с использованием технологии синтеза локус-специфических ДНК-зондов на основе ПЦР длинных фрагментов. Генетика. Т. 56. № 6. С. 704. (Zhigalina D.I., Skryabin N.A., Vasilieva O.Yu., Lopatkina M.E.I., Vasiliev S.A., Sivokha V.M., Belyaeva E.O., Savchenko R.R., Nazarenko L.P., Lebedev I.N. 2020. FISH diagnostics of chromosomal translocation with the technology of synthesis of locus-specific dna probes based on long-range PCR. Russian J. Gen. V. 56. № 6. P. 704.)
- Рубцов Н.Б. 2006. Методы работы с хромосомами млекопитающих: учебное пособие. Новосибирский гос. ун-т. Новосибирск. 152 с. (Rubtsov N.B. 2006. Metody raboty s hromosomami mlekopitayushchih: ucheb. posobie. Novosib. gos. un-t. Novosibirsk. 152 p.)
- Твеленёва А.А., Шилова Н.В. 2019. Методы верификации субмикроскопических клинически значимых вариаций числа копий участков ДНК. Медицинская генетика. Т. 18. № 3. С. 26. (Tveleneva A.A., Shilova N.V. 2019. Methods for verification of submicroscopic pathogeni copy number variations. Medicinskaya genetika [Medical genetics]. V. 18. № 3. С. 26.)
- Херрингтон С., МакГи Дж. (Под. ред.) 1999. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М. Мир. 558 с. (Herrington C., McGee J. (Eds.) 1999. Diagnostic molecu-

- lar pathology. A practical approach. Oxford University Press. 558 p.)
- Alamri A., Nam J.Y., Blancato J.K. 2017. Fluorescence in situ hybridization of cells, chromosomes, and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Methods Mol. Biol.* V. 1606. P. 265.
- Bagheri G., Lehner J.D., Zhong J. 2017. Enhanced detection of Rickettsia species in Ixodes pacificus using highly sensitive fluorescence in situ hybridization coupled with tyramide signal amplification. *Ticks Tick Borne Dis.* V. 8. P. 915.
- Bobrow M.N., Harris T.D., Shaughnessy K.J., Litt G.J. 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods.* V. 125. P. 279.
- Buckley K.M., Dong P., Cameron R.A., Rast J.P. 2018. Bacterial artificial chromosomes as recombinant reporter constructs to investigate gene expression and regulation in echinoderms. *Brief Funct. Genomics.* V. 17. P. 362.
- Chen H., Feng X., Jiang M., Xiao B., Zhang J., Zhang W., Hu Y., Sui Z. 2020. Estimating the ploidy of Gracilariopsis lemaneiformis at both the cellular and genomic level. *J. Phycol.* V. 56. P. 1339.
- Chen Y., Zhang Y., Wang Y., Zhang L., Brinkman E.K., Adam S.A., Goldman R., van Steensel B., Ma J., Belmont A.S. 2018. Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler. *J. Cell Biol.* V. 217. P. 4025.
- Cheung S.W., Bi W. 2018. Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* V. 18. P. 531.
- Cole S.H., Carney G.E., McClung C.A., Willard S.S., Taylor B.J., Hirsh J. 2005. Two functional but noncomplementing Drosophila tyrosine decarboxylase genes: distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J. Biol. Chem.* V. 280. P. 14948.
- Dimitri P. 2004. Fluorescent in situ hybridization with transposable element probes to mitotic chromosomal heterochromatin of Drosophila. *Methods Mol. Biol.* V. 260. P. 29.
- Einarson O.J., Sen D. 2017. Self-biotinylation of DNA G-quadruplexes via intrinsic peroxidase activity. *Nucleic Acids Res.* V. 45. P. 9813.
- Florijn R.J., Bonden L.A., Vrolijk H., Wiegant J., Vaandrager J.W., Baas F., den Dunnen J.T., Tanke H.J., van Ommen G.J., Raap A.K. 1995. High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum. Mol. Genet.* V. 4. P. 831.
- Fominaya A., Loarce Y., González J.M., Ferrer E. 2016. Tyramide signal amplification: fluorescence in situ hybridization for identifying homoeologous chromosomes. *Methods Mol. Biol.* V. 1429. P. 35.
- Francisco-Cruz A., Parra R., Tetzlaff M.T., Wistuba II. 2020. Multiplex immunofluorescence assays. *Methods Mol. Biol.* V. 2055. P. 467.
- Foster H.A., Sturmey R.G., Stokes P.J., Leese H.J., Bridger J.M., Griffin D.K. 2010. Fluorescence in situ hybridization on early porcine embryos. *Methods Mol. Biol.* V. 659. P. 427.
- Green M.R., Sambrook J. 2020. Labeling of DNA probes by nick translation. *Cold Spring Harb Protoc.* V. 7. P. 100602.
- Gross R.A., Kumar A., Kalra B. 2001. Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Chem. Rev.* V. 101. P. 2097.
- Hopman A.H.N., Ramaekers F.C.S., Speel E.J.M. 1998. Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochrome-labeled tyramides and their application for *in situ* hybridization using CARD-amplification. *J. Histochem. Cytochem.* V. 46. P. 771.
- Hoskins R.A., Smith C.D., Carlson J.W., Carvalho A.B., Halpern A., Kaminker J.S., Kennedy C., Mungall C.J., Sullivan B.A., Sutton G.G., Yasuhara J.C., Wakimoto B.T., Myers E.W., Celniker S.E., Rubin G.M., Karpen G.H. 2002. Heterochromatic sequences in a Drosophila whole-genome shotgun assembly. *Genome Biol.* V. 3. P. RESEARCH0085.
- Khrustaleva L., Kudryavtseva N., Romanov D., Ermolaev A., Kirov I. 2019. Comparative Tyramide-FISH mapping of the genes controlling flavor and bulb color in Allium species revealed an altered gene order. *Sci. Rep.* V. 9. P. 12007.
- Kudryavtseva N., Ermolaev A., Karlov G., Kirov I., Shigyo M., Sato S., Khrustaleva L. 2021. A dual-color Tyr-FISH method for visualizing genes/markers on plant chromosomes to create integrated genetic and cytogenetic maps. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 5860.
- Larracuente A.M., Ferree P.M. 2015. Simple method for fluorescence DNA *in situ* hybridization to squashed chromosomes. *J. Vis. Exp.* V. 95. P. 52288.
- Levy B., Wapner R. 2018. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertil. Steril.* V. 109. P. 201.
- Liehr T., Weise A., Hamid A.B., Fan X., Klein E., Aust N., Othman M.A., Mrasek K., Kosyakova N. 2013. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* V. 13. P. 251.
- Liehr T. 2018. Chromothripsis detectable in small supernumerary marker chromosomes (sSMC) using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Methods Mol. Biol.* V. 1769. P. 79.
- Monaco A.P., Larin Z. 1994. ACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol.* V. 12. P. 280.
- Morozkin E.S., Karamysheva T.V., Laktionov P.P., Vlassov V.V., Rubtsov N.B. 2013. DNA probes for FISH analysis of C-negative regions in human chromosomes. *Methods Mol. Biol.* V. 1039. P. 233.
- Navarro-Domínguez B., Ruiz-Ruano F.J., Camacho J.P.M., Cabrero J., López-León M.D. 2017. Transcription of a B chromosome CAP-G pseudogene does not influence normal condensin complex genes in a grasshopper. *Sci. Rep.* V. 7. P. 17650.
- Nielsen K.L., Indiani C., Henriksen A., Feis A., Becucci M., Gajhede M., Smulevich G., Welinder K.G. 2001. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. *Biochem. J.* V. 40. P. 11013.
- Pandey V.P., Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N. 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem.* V. 6. P. 308.
- Pérez R., de Bustos A., Jouve N., Cuadrado A. 2009. Localization of Rad50, a single-copy gene, on group 5 chromosomes of wheat, using a FISH protocol employing tyramide for signal amplification (Tyr-FISH). *Cytogenet. Genome Res.* V. 125. P. 321.
- Raap A.K., van de Corput M.P., Vervenne R.A., van Gijlswijk R.P., Tanke H.J., Wiegant J. 1995. Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum. Mol. Genet.* V. 4. P. 529.

- Rees J.S., Li X.W., Perrett S., Lilley K.S., Jackson A.P. 2015. Selective proteomic proximity labeling assay using tyramide (SPPLAT): a quantitative method for the proteomic analysis of localized membrane-bound protein clusters. *Curr. Protoc. Protein Sci.* V. 80. P. 19.27.1.
- Rosa F.E., Santos R.M., Rogatto S.R., Domingues M.A. 2013. Chromogenic *in situ* hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/neu status in breast carcinomas. *Braz. J. Med. Biol. Res.* V. 46. P. 207.
- Sader M.A., Dias Y., Costa Z.P., Munhoz C., Penha H., Bergès H., Vieira M.L.C., Pedrosa-Harand A. 2019. Identification of passion fruit (*Passiflora edulis*) chromosomes using BAC-FISH. *Chromosome Res.* V. 27. P. 299.
- Sáez A., Andreu F.J., Seguí M.A., Baré M.L., Fernández S., Dináres C., Rey M. 2006. HER-2 gene amplification by chromogenic *in situ* hybridisation (CISH) compared with fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. *Breast.* V. 15. P. 519.
- Sarac I., Hollenstein M. 2019. Terminal deoxynucleotidyl transferase in the synthesis and modification of nucleic acids. *Chembiochem.* V. 20. P. 860.
- Schriml L.M., Padilla-Nash H.M., Coleman A., Moen P., Nash W.G., Menninger J., Jones G., Ried T., Dean M. 1999. Tyramide signal amplification (TSA)-FISH applied to mapping PCR-labeled probes less than 1 kb in size. *Biotechniques.* V. 27. P. 608.
- Speel E.J., Hopman A.H., Komminoth P. 2006. Tyramide signal amplification for DNA and mRNA *in situ* hybridization. *Methods Mol. Biol.* V. 326. P. 33.
- Speel E. 1999. Detection and amplification systems for sensitive, multiple-target DNA and RNA *in situ* hybridization: looking inside cells with a spectrum of colors. *Histochem.* V. 112. P. 89.
- Speel E.J., Hopman A.H., Komminoth P. 1999. Amplification methods to increase the sensitivity of *in situ* hybridization: play card(s). *J. Histochem. Cytochem.* V. 47. P. 281.
- Stack E.C., Wang C., Roman K.A., Hoyt C.C. 2014. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods.* V. 70. P. 46.
- Veselinová D., Mašlanková J., Kalinová K., Mičková H., Marešková M., Rabajdová M. 2021. Selected *in situ* hybridization methods: principles and application. *Molecules.* V. 26. P. 3874.
- Ye C.J., Heng H.H. 2017. High resolution fiber-fluorescence *in situ* hybridization. *Methods Mol. Biol.* V. 1541. P. 151.
- Yurchenko D.A., Minzhenkova M.E., Dadali E.L., Markova Z.G., Rudenskaya G.E., Matyushchenko G.N., Kanivets I.V., Shilova N.V. 2022. Clinical manifestations of various molecular cytogenetic variants of eight cases of “8p inverted duplication/deletion syndrome”. *Biomedicines.* V. 10. P. 567.

Tyramide Signal Amplification: New Opportunities for DNA *In Situ* Hybridization

E. O. Vorontsova^{a, b, *}, D. A. Yurchenko^a, and N. V. Shilova^a

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia

^bPirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: veo.1998@mail.ru

DNA *in situ* hybridization (DNA-ISH) is a widely used method in molecular cytogenetics that allows the localization of specific DNA sequences in particular regions of chromosomes. Implementation of DNA-ISH requires the use of DNA probes, which can be commercial or developed for specific research purposes as non-commercial (homemade) DNA probes. One of the significant drawbacks of non-commercial probes is the difficulty in obtaining a high signal intensity with a small DNA probe size. Therefore, developing approaches to enhance non-commercial DNA probes is an important task in modern molecular cytogenetics. To directly visualize small DNA sequences on a chromosome, the tyramide signal amplification (TSA) method is used. The TSA system is based on the formation of a covalent bond between electron-rich protein fragments in the sample and tyramide molecules linked to a hapten (in chromogenic *in situ* hybridization) or a fluorophore (in fluorescent *in situ* hybridization). This is achieved by converting tyramide molecules into free-radical intermediate compounds under the action of horseradish peroxidase (HRP), followed by deposition of precipitated molecules nearby. As a result, a low-intensity signal is amplified. Thus, TSA is a good complement to the DNA-ISH method, thanks to its high sensitivity and ability to detect small genomic imbalances, and can therefore become a valuable tool for diagnosing chromosomal rearrangements in clinical practice.

Keywords: tyramide, DNA, tyramide amplification, fluorescent *in situ* hybridization, chromogenic *in situ* hybridization