

ТИРАМИДНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ СИГНАЛА: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИИ ДНК

© 2023 г. Е. О. Воронцова^{1, 2, *}, Д. А. Юрченко¹, Н. В. Шилова¹

¹Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, Москва, 115478 Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, 117997 Россия

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

Поступила в редакцию 10.03.2023 г.

После доработки 17.04.2023 г.

Принята к публикации 20.04.2023 г.

Гибридикация ДНК *in situ* (*in situ* hybridization, ISH) — широко используемый метод молекулярной цитогенетики, который позволяет локализовать конкретные последовательности ДНК в определенных участках хромосом. Для реализации гибридикации ДНК *in situ* необходимо использование ДНК-зондов, которые могут быть коммерческими (серийными), а также несерийными, т.е. могут быть разработаны под конкретные задачи исследования (*homemade*). Одним из существенных недостатков последних является низкая интенсивность гибридикационного сигнала, когда ДНК-зонд имеет небольшие размеры. Поэтому разработка подходов, направленных на получение оптимального соотношения шум/сигнал при использовании таких несерийных ДНК-зондов, является актуальной задачей современной молекулярной цитогенетики. Методом, позволяющим визуализировать небольшие последовательности ДНК непосредственно на хромосоме, является тирамидная амплификация сигнала (*tyramide signal amplification*, TSA). В основе системы TSA лежит образование ковалентной связи между богатыми электронами фрагментами белков образца и молекулами тирамида, связанными с гаптенем (при хромогенной ISH) или флуорофором (при флуоресцентной ISH). Это реализуется за счет превращения молекул тирамида в свободнорадикальные промежуточные соединения под действием пероксидазы хрена (HRP), а затем отложения осажденных молекул вблизи нее. В результате наблюдается усиление сигнала малой интенсивности. Таким образом, TSA является хорошим дополнением метода гибридикации ДНК *in situ* благодаря своей высокой чувствительности и возможности детекции небольших геномных дисбалансов и, соответственно, может стать ценным инструментом для диагностики хромосомных перестроек в клинической практике.

Ключевые слова: тирамид, ДНК, тирамидная амплификация, флуоресцентная гибридикация *in situ*, хромогенная гибридикация *in situ*

DOI: 10.31857/S0041377123040120, **EDN:** ZLKOVG

В настоящее время в клинической практике в качестве дополнительного метода детекции вариаций числа копий участков ДНК (*copy number variations*, CNV) широко используется гибридикация ДНК *in situ* (*in situ* hybridization, ISH) (Liehr, 2018; Veselinyova et al., 2021; Yurchenko et al., 2022). Такой подход позволяет локализовать искомую последовательность в определенной области метафазной хромосомы или интерфазного ядра (Larracuente, Ferree, 2015). Этот принцип также лежит в основе и других молекулярно-цитогенетических методов: сравни-

тельной геномной гибридикации (*array comparative genomic hybridization*, aCGH) (Cheung, Bi, 2018) и хромосомного микроматричного анализа (Levy, Warner, 2018).

Использование традиционных FISH-технологий с коммерческими ДНК-зондами нашло широкое применение при детекции вариаций числа копий исследуемого фрагмента ДНК значительных размеров. В частности, обнаружение теломерных и центромерных районов является реализуемой задачей, учитывая, что они представлены в геноме в виде большого количества повторов и локально сгруппированы (Hoskins et al., 2002; Dimitri, 2004). В то же время визуализация уникальных эухроматиновых районов хромосом требует использования либо протяженных зондов с высокой специфичностью, либо нескольких, близких по расположению на участке хромосомы меньших по размеру зондов, которые

Принятые сокращения: CISH — хромогенная *in situ* гибридикация (*chromogenic in situ hybridization*); CNV — вариации числа копий участков ДНК (*copy number variation*); dUTP — дезоксиуридинтрифосфат; HRP — пероксидаза хрена (*horseradish peroxidase*); FISH — флуоресцентная *in situ* гибридикация (*fluorescence in situ hybridization*); TSA — тирамидная амплификация сигнала (*tyramide signal amplification*).

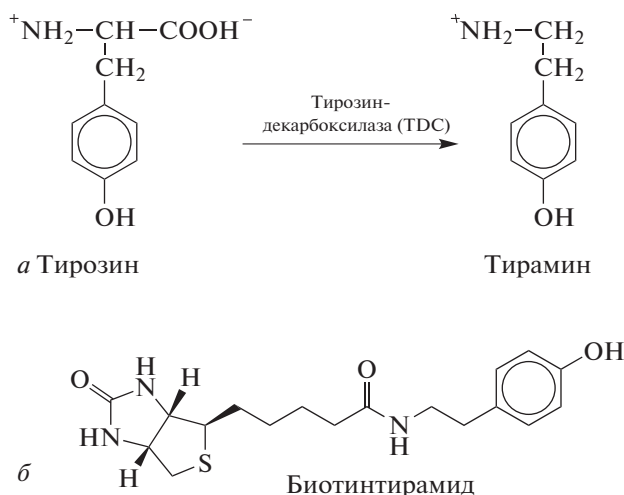


Рис. 1. Синтез тирамина из тирозина. Реакция декарбоксилирования тирозина с образованием тирамина (а) сопровождается каталитической активностью тирозин-декарбоксилазы (TDC). (б) — Биотинилированное производное тирамина — биотинтирамид. Тирамин и биотин соединены посредством амидной связи. Адаптировано из: Cole et al., 2005 (а) и Einarson, Sen, 2017 (б).

суммарно дают более интенсивный сигнал, чем каждый из них по отдельности. Однако такой подход затруднительно использовать при визуализации однокопийных последовательностей, размер которых составляет чуть более 1 тыс. пар нуклеотидов (т. п. н.) (Schriml et al., 1999), поскольку интенсивность гибридационного сигнала будет низка и несопоставима с коммерческими (серийными) ДНК-зондами. В этом случае необходима разработка локус-специфичных несерийных (homemade) ДНК-зондов с последующей амплификацией полученного сигнала.

К таким однокопийным последовательностям можно отнести клинически значимые CNV размером, незначительно превышающим 1 т. п. н. (субмикроскопические CNV), определение происхождения которых является важным этапом для понимания этиологии генетических заболеваний, а также механизма формирования конститутивных хромосомных аномалий. Выявление таких субмикроскопических CNV при молекулярном кариотипировании требует проведения подтверждающей диагностики альтернативными методами (методы валидации/верификации) с целью исключения ложноположительных результатов (Твеленёва, Шилова, 2019). В этих случаях для детекции хромосомных аномалий, включающих в перестройку небольшие по протяженности участки ДНК, возможно применение технологии усиления сигнала, в частности усиление сигнала с использованием тирамида — метода тирамидной амплификации сигнала (tyramide signal amplification — TSA) (Рубцов, 2006). Интенсивность сигнала повышается благодаря активации тирамида, под действием каталитической активности пероксидазы хрена (horseradish peroxidase, HRP) и его связы-

ванию с радикалами аминокислот в цитологическом препарате, что приводит к отложению большого количества молекул тирамида и позволяет локально сконцентрировать сигнал (Stack et al., 2014). В методе TSA чаще всего применяется подход непрямой визуализации сигнала, что подразумевает использование антител к молекуле тирамида, связанной с репортерной молекулой (биотином, диоксигенином, динитрофенолом), что способствует еще большему накоплению и усилению сигнала, за счет увеличенной локальной концентрации флуоресцентной или хромогенной метки в исследуемых образцах. Таким образом, этот метод позволяет значительно повысить чувствительность визуализации гибридационного сигнала (Perez et al., 2009).

Задачей настоящего обзора является обобщение сведений о методе тирамидной амплификации сигнала, как дополнительного этапа для проведения гибридализации ДНК *in situ*, что позволяет оптимизировать детекцию CNV, размером незначительно превышающим 1 т. п. н. за счет увеличения интенсивности гибридационного сигнала при выполнении молекулярно-цитогенетических исследований.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОСНОВА ТИРАМИДНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

TSA представляет собой метод ферментативной амплификации и используется для повышения чувствительности обнаружения ДНК-мишени при гибридализации *in situ* (Bobrow et al., 1989) и иммуногистохимии (Атякшин и др., 2022). В основе повышения чувствительности лежит реакция превращения тирамида в окисленное высоко реакционноспособное свободнорадикальное промежуточное соединение. Тирамид является биотинилированным производным тирамина, биогенного амина, синтезируемого из тирозина под действием тирозиндекарбоксилазы, который содержит аминогруппу на одном конце и фенол — на другом (рис. 1а). Аминогруппа способствует конъюгации молекулы тирамина с биотином путем образования амидной связи (рис. 1б). Промежуточные продукты реакции ковалентно связываются с нуклеофильными аминокислотными радикалами, такими как тирозин и триптофан, ядерного или цитоплазматического матриц (рис. 2).

Усиление сигнала происходит за счет отложения большого количества тирамидов и их связывания с аминокислотными радикалами ядерных и цитоплазматических белков на предметном стекле, в месте связывания пероксидазы или в непосредственной близости (Nielsen et al., 2001). Радикалы, являясь высоко реакционноспособными агентами, взаимодействуют с молекулами воды или другими радикалами и активно распадаются по мере диффузии от активного центра пероксидазы, ограничивая радиус меченного примерно до 200 нм (Rees et al., 2015). Значительное снижение интенсивности сигнала, по мере удаления от активного центра фермента, также мо-

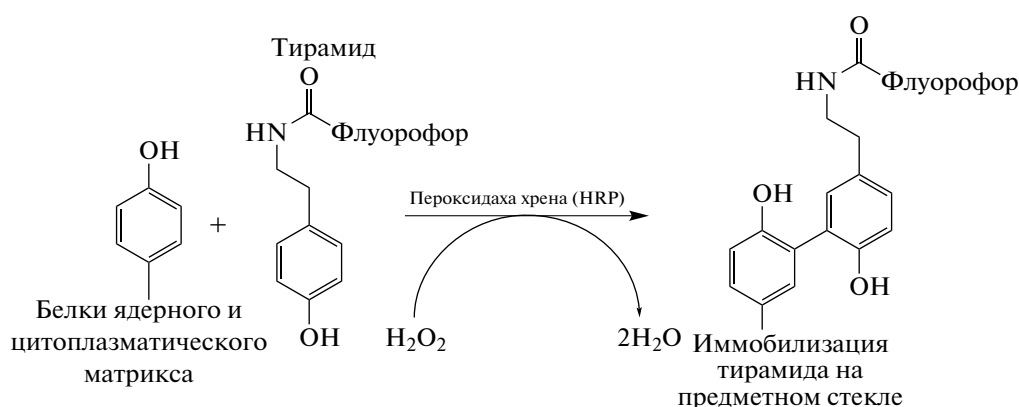


Рис. 2. Пероксидаза хрена (HRP) расщепляет перекись водорода (H_2O_2), обеспечивая окисление фенольного субстрата (тирамида) и образование ковалентных связей с остатками белков ядерного и цитоплазматического матриксов (Kudryavtseva et al., 2021; open access).

жет быть связано с ограниченным количеством реагирующих участков хроматина. Авторы (Chen et al., 2018) утверждают, что коровые гистоны не являются оптимальной мишенью для мечения тирамидом, что связано с низкой реактивностью тирозинов гистонов внутри нуклеосомы, поскольку 13 из 15 нативных нуклеосомных тирозинов недоступны для реакции. Поэтому повторение этапов TSA, в частности активного отложения тирамида на аминокислотных радикалах, может способствовать увеличению интенсивности сигнала. Однако этапы рекомендуется повторять не более двух–трех раз, поскольку это может привести к увеличению неспецифического фонового сигнала.

Важным шагом при проведении TSA является добавление пероксида водорода (H_2O_2). Строение активного центра пероксидазы хрена позволяет использовать его для инактивации фермента. При низких концентрациях в домене трехвалентного гема происходит гетерологичное расщепление H_2O_2 (Nielsen, 2001). При избытке H_2O_2 железо активного центра фермента окисляется до двухвалентного состояния, и в результате активность фермента гасится (Pandey et al., 2017).

Метод тирамидной амплификации сигнала включает несколько основных этапов, показанных на рис. 3. 1) В первую очередь, необходимо провести гибридизацию ДНК *in situ* (CISH или FISH), в результате которой происходит ковалентное связывание ДНК-последовательности с разработанным (несерийным) ДНК-зондом, в который включен модифицированный нуклеотид (М), именно с этой областью будет происходить связывание антител. Модифицированный нуклеотид представляет собой нуклеотид с флуоресцентной или гаптенной меткой для возможности его дальнейшего распознавания. 2) Далее происходит взаимодействие модифицированного нук-

леотида с первичными антителами, специфичными к выбранной мишени. 3) На следующем этапе проводится инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с ферментативной меткой. 4) Затем в реакцию добавляется соединение тирамида, которое под действием пероксидазы при добавлении H_2O_2 превращается в высоко реакционное соединение, молекулы которого осаждаются вблизи места связывания пероксидазы хрена, образуя ковалентные связи с нуклеофильными радикалами аминокислот белков ядерного и цитоплазматического матриксов (Gross et al., 2001). После основных стадий TSA следует этап 5 – визуализация.

Существует два подхода к детекции исследуемых молекул: прямой и непрямой. Выбор метода визуализации происходит в зависимости от того, с какой молекулой связан тирамид: флуорофором (Texas Red, FITC или Cy3) или молекулой-гаптеном, например, биотином, дигоксигенином или динитрофенолом (Speel et al., 2006). Если тирамид конъюгирован с флуоресцентной меткой, то визуализация гибрида проводится непосредственно после TSA и контрокрашивания ядер с помощью красителя DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид) с использованием оборудования для флуоресцентной микроскопии (Ведяйкин и др., 2019). Если тирамид связан с репортерными молекулами, такими как биотин, дигоксигенин или динитрофенол, необходимо использование вторичных антител или соединений, обладающих высоким сродством к этим соединениям: авидин (стрептавидин), антидигоксигенин и антитела к динитрофенолу соответственно с последующей флуоресцентной или хромогенной детекцией (Stack et al., 2014).

На этапе амплификации сигнала возможно использование биотинилированных тирамидов, полученных от фирм-производителей, либо соединений

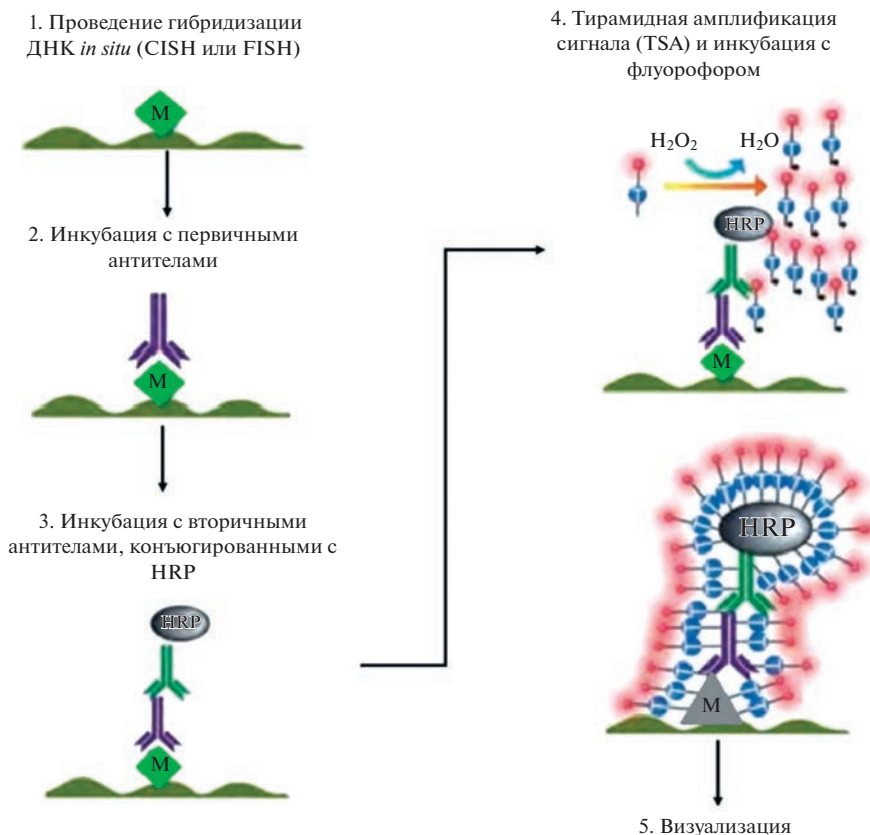


Рис. 3. Основные этапы метода тирамидной амплификации сигнала (TSA). М — модифицированный нуклеотид ДНК-зонда; HRP — пероксидаза хрена (фермент, катализирующий превращение неактивного тирамида в активное соединение в присутствии пероксида водорода). Адаптировано из: Francisco-Cruz et al., 2020.

тирамида, синтезированных в самой лаборатории (Bobrow et al., 1989; Raap et al., 1995). В случае использования только синтезированных биотинилированных тирамидов возникает проблема неспецифичности сигнала из-за высокого содержания эндогенного биотина в тканях, таких как печень и почки. Следовательно, при анализе цитологических препаратов из этих тканей оптимальным является альтернативный подход с использованием тирамидов, меченных дигоксигенином, ди- или тринитрофенолом или флуорофорами (Norman et al., 1998).

Благодаря методу TSA можно обнаруживать однокопийные последовательности ДНК размером около 1 т. п. н. (Raap et al., 1995; Schriml et al., 1999) в связи с тем, что эта система позволяет повышать чувствительность и эффективность гибридизованных сигналов ISH в 100–1000 раз по сравнению с методами без усиления сигнала (Perez et al., 2009). Несмотря на то, что TSA проводится после использования метода гибридизации ДНК *in situ*, специфичность взаимодействия не снижается, что является еще одним преимуществом ее использования (Speel, 1999; Speel et al., 1999).

ТИРАМИДНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ СИГНАЛА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ *IN SITU* ГИБРИДИЗАЦИИ ДНК

Гибридизация ДНК *in situ* является важным инструментом исследований в молекулярной и клеточной патологии (Херрингтон, Макги, 1999; Foster et al., 2010). Широкий спектр хромосомных аномалий, таких как транслокации, инверсии, инсерции, делеции и дупликации, выявляют с помощью флуоресцентной гибридизации ДНК *in situ* (Fluorescence *in situ* hybridization — FISH) (Liehr et al., 2013; Morozkin et al., 2013). Несмотря на высокую специфичность метода FISH, до сих пор не удается рутинно анализировать CNV размером немногим более 1 т. п. н. с помощью традиционных протоколов исследования. В молекулярной онкологии используется модификация метода — хромогенная гибридизация *in situ* (chromogenic *in situ* hybridization — CISH).

FISH и CISH с использованием TSA

Методы FISH и CISH основаны на принципе комплементарного взаимодействия между целевой последовательностью нуклеиновой кислоты (ми-

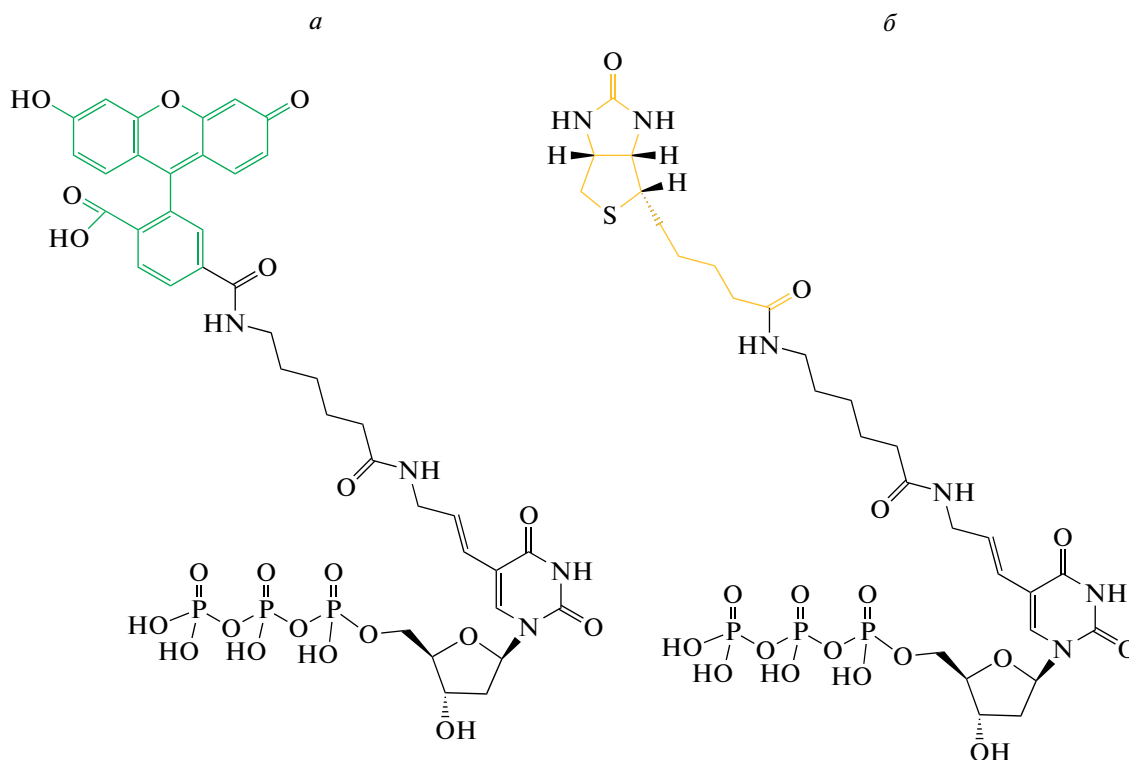


Рис. 4. Флуоресцеин-12-dUTP (а) и биотин-11-dUTP (б). а — Модифицированный нуклеотид, соединенный с флуорофором (зеленый цвет), включается в реакции ник-трансляции при синтезе олигонуклеотидных зондов, с последующей возможностью детекции комплементарного связывания с мишенью с помощью флуоресцентного микроскопа (метод FISH). — Модифицированный нуклеотид, соединенный с биотином (оранжевый цвет), включается в реакции ник-трансляции при синтезе олигонуклеотидных зондов; для детекции необходимо использование специфических антител к биотину (стрептавидин), связанных с хромогенной меткой, фермент и хромогенный субстрат (метод CISH).

шень) и ДНК-зондом с последующей системой детекции в зависимости от способов модификации нуклеотидов в составе ДНК-зонда (рис. 4) (Херрингтон, Макги, 1999; Alamri et al., 2017). Для введения в ДНК модифицированных нуклеотидов могут быть использованы разные подходы. Молекула флуорофора ковалентно соединяется с нуклеотидом (модифицированный нуклеотид) и вносится в последовательность синтезируемых ДНК-зондов в реакциях, катализируемых, в частности, терминальной дезоксирибонуклеотидил-трансферазой (TdT) при концевом мечении (Sarac, Hollenstein, 2019), ДНК-азой I и ДНК-полимеразой I в реакции ник-трансляции (Green, Sambrook, 2020) и ДНК-полимеразой I при включении модифицированных нуклеотидов во вновь синтезируемую цепь при проведении полимеразной цепной реакции (Veselinová et al., 2021) (рис. 4а).

При CISH используемые комплементарные мишени (ДНК-зонды) включают нуклеотиды, ковалентно соединенные с гаптанами (биотином, дигоксином или динитрофенолом) (рис. 4б). Особенностью CISH является стойкость гибридационных сигналов. Они не ослабевают со временем, в отличие от флуоресцентных сигналов при FISH-методе. Так-

же при CISH имеется возможность использования дополнительных методов окраски для визуализации морфологии клеток и структурных компонентов ткани. Некоторые исследования показывают, что CISH-метод сопоставим с FISH (Sáez et al., 2006). Однако имеются данные о том, что CISH показывает более низкую чувствительность к низкоуровневым амплификациям (малокопийным последовательностям) (Rosa et al., 2013).

В настоящее время FISH является широко используемым методом исследования и анализа нуклеиновых кислот (Liehr, 2018; Veselinova et al., 2021; Yurchenko et al., 2022). Для обнаружения протяженных однокопийных последовательностей ДНК широкую распространенность получили библиотеки на основе искусственных бактериальных (bacterial artificial chromosome — BAC) и дрожжевых хромосом (yeast artificial chromosomes — YAC), позволяющие покрыть большую часть генома человека (Рубцов, 2006; Sader et al., 2019). В YAC размер вставки ДНК находится в пределах 100–2000 т. п. н., а значительным недостатком использования такого вектора является его нестабильность и способность к спонтанному удалению фрагментов вставки (Monaco, Larin,

Таблица 1. Модифицированные нуклеотиды в составе ДНК-зондов и система усиления

Размер зонда, п. н.	Способ мечения	Метка	Система усиления сигнала	Источник литературы
319, 608, 855	ПЦР	Биотин-dUTP : dNTPs (1 : 7)	SA-HRP + тирамид-Cy3, SA-HRP + тирамид-биотин + SA-FITC	Schriml et al., 1999
200	ПЦР с внутренними праймерами	Биотин-dUTP : dNTPs (1 : 2)	SA-HRP + тирамид-Cy3	Fominaya et al., 2016
630, 1480	ПЦР	Дигоксигенин-dUTP : dNTPs (1 : 3)	Антидигоксигенин-HRP + тирамид-Alexa Fluor 568	Bagheri et al., 2017
1355, 1420	Случайное праймирование	Дигоксигенин-dUTP : dNTPs (1 : 100)	Анти-дигоксигенин-HRP + тирамид-FITC	Navarro-Domínguez et al., 2019
1000, 1100, 1200	Ник-трансляция	Дигоксигенин-dUTP, биотин-dUTP	Антидигоксигенин-HRP + тирамид-FITC, SA-HRP + тирамид-Cy3	Khrustaleva et al., 2019
395, 420	ПЦР	Дигоксигенин-dUTP : dNTPs (1 : 3)	Анти-дигоксигенин-HRP + тирамид-FITC	Chen et al., 2020

Примечание. Cy3 – Cyanine-3; dUTP – дезоксиуридинтрифосфаты; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; SA-HRP – стрептавидин-пероксидаза хрена.

1994). Фрагменты ДНК, клонированные в ВАС, имеют размер 100–300 т. п. н. (Buckley et al., 2018). Из-за значительной протяженности клонированных участков ДНК такие генетические конструкции не позволяют выявлять клинически значимые CNV меньшего размера. Применение олигонуклеотидов для получения локус-специфических ДНК-зондов встречается реже, ввиду необходимости подбора индивидуальных условий в каждом конкретном случае, что приводит к увеличению времени проведения такого анализа. Значимым преимуществом разработки ДНК-зондов на основе олигонуклеотидов является доступность реактивов и, как следствие, низкая стоимость исследования (Жигалина и др., 2020).

Обнаружение уникальных последовательностей размером около 1 т. п. н. долгое время представляло собой сложную задачу. Например, к группе методов, применяемых в таких случаях, относится fiber-FISH и его модификации. Fiber-FISH представляет собой метод, позволяющий картировать хромосомные области с высоким разрешением до 1 т. п. н. на “фибрилле” ДНК. В основе метода лежит расплетение нитей ДНК, их растяжение и фиксация в таком состоянии на предметном стекле перед гибридизацией хромосомного препарата с ДНК-зондами (Florijn et al., 1995). Однако к недостаткам этого метода можно отнести неоднородное растяжение хромосомных нитей и, как следствие, разное разрешение на участках хромосом, а также длительный протокол приготовления препарата (Ye, Heng, 2017). В настоящее время для обнаружения при гибридизации *in situ* нуклеотидных последовательностей размером около 1 т. п. н. выгодно использовать системы TSA (табл. 1).

Протокол метода TSA-in situ гибридизации

Протокол проведения TSA включает несколько основных этапов, которые могут варьировать по времени в небольшом диапазоне в зависимости от выбранного набора реактивов. На первой стадии хромосомный препарат обрабатывают блокирующим буфером (TNB) во влажной камере в течение 30–60 мин. Затем его инкубируют в 100 мкл раствора первичных антител в зависимости от меченых нуклеотидов в составе ДНК-зонда. В случае с биотинилированными нуклеотидами в качестве первичных антител используют стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (SA-HRP), обычно разведенный в соотношении 1 : 100 в буфере TNB, в течение 1 ч во влажной камере. Затем идет этап промывки в специальном буфере (TNT), обычно 3 раза по 5 мин при осторожном встряхивании. После этого производят инкубацию с 100 мкл биотинилтирамида, разбавленным (1 : 50) амплифицирующим буфером, в течение 5–10 мин во влажной камере. Следующим этапом удаляют раствор тирамида, как правило, путем трех промывок по 5 мин в специальном TNT-буфере. Детекцию биотинилтирамида осуществляют инкубацией хромосомных препаратов с флуоресцентно-меченым стрептавидином в течение 1 ч во влажной камере. Затем после трех промывок в промывочном буфере препарат окрашивают красителем DAPI и проводят визуализацию (Perez et al., 2009). Протокол не является универсальным, поэтому необходим индивидуальный подбор условий в каждом конкретном исследовании.

Как было сказано выше, в результате каталитической активности пероксидазы образуется высоко реакционноспособное промежуточное соединение тирамида, которое связывается с аминокислотными

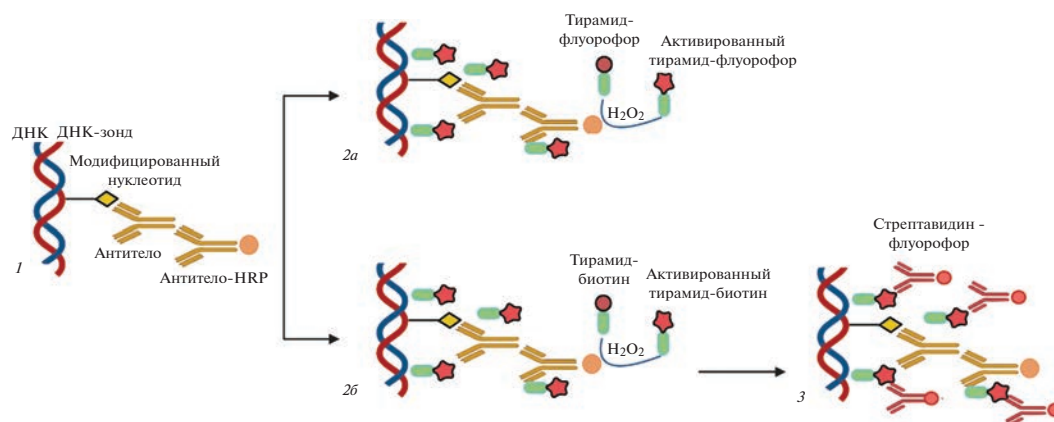


Рис. 5. Схема прямого и непрямого подхода к детекции комплементарного взаимодействия между несерийным ДНК-зондом и целевой последовательностью ДНК. 1 – Взаимодействие между модифицированным нуклеотидом (флуоресцентно-меченым/связанным с гаптеном) и специфическим первичным антителом (антитело) при дальнейшем добавлении вторичного флуорофора, с дальнейшим получением высоко реакционноспособного соединения тирамида, которое образует ковалентные связи с аминокислотными нуклеофильными радикалами белков на предметном стекле; анализ взаимодействия проводят на флуоресцентном микроскопе. 2б – Добавление в систему тирамида, меченного гаптеном (биотин), с дальнейшим образованием высоко реакционноспособного соединения тирамида, которое образует ковалентные связи с аминокислотными нуклеофильными радикалами белков на предметном стекле. 3 – Добавление специфических к гаптену антител, связанных с флуоресцентной меткой (стрептавидин-флуорофор, не прямой способ); анализируют взаимодействия с помощью флуоресцентного микроскопа. Использование непрямого метода детекции позволяет повысить интенсивность сигнала в 100–1000 раз за счет увеличения локальной концентрации флуоресцентной метки.

остатками белков в непосредственной близости от каталитического центра пероксидазы хрена (рис. 5). Визуализация отложившихся тирамидов может проводиться либо непосредственно после реакции TSA с помощью флуоресцентной микроскопии, если используются меченные флуорофором тирамиды (Texas Red, FITC, Cy3), либо косвенно при добавлении специфических антител, если в качестве гаптена используется производное биотина или дигоксигенина.

В целом, TSA имеет достаточно преимуществ и в некоторых исследованиях является методом выбора, однако наряду с этим он имеет и недостатки (табл. 2). Усиление сигнала и, как следствие, высокая чувствительность метода возможны благодаря отложению активированного тирамида, которое позволяет обнаружить небольшие участки ДНК (субмикроскопические CNV). К преимуществам TSA также можно отнести совместимость метода с объектами разных типов: клетками, тканями, целыми организмами. Еще одним преимуществом TSA является ее способность обнаруживать несколько целевых участков (мультиплексирование) за счет использования вторичных антител, флуоресцентные или хромогенные метки которых испускают свет в разных волновых диапазонах (Speel et al., 2006).

Несмотря на преимущества метода TSA, можно выделить ряд недостатков, ограничивающих его применение в ряде исследований. Одним из наиболее существенных недостатков метода является, например, чувствительность к высокому фону из-за неспецифического связывания соединения тирамида

или наличия эндогенных пероксидаз (Schriml et al., 1999). Кроме того, избыточное использование тирамида в реакции может привести к гашению флуоресцентного или хромогенного сигнала, что снижает его количественную оценку. Еще одним недостатком является сложность оптимизации протокола TSA, поскольку необходимо учитывать множество параметров, таких как концентрация антител и блокирующих реагентов, время и температура инкубации, что может занимать достаточно продолжительное время. И при выборе различных первичных и вторичных антител для разных целей, а также длительном подборе условий, TSA может оказаться дорогим исследованием. Поэтому, хотя TSA является мощным методом повышения интенсивности сигнала, важно учитывать эти недостатки при планировании экспериментов и интерпретации результатов.

Таблица 2. Преимущества и недостатки использования метода TSA

Преимущества	Недостатки
Усиление сигнала	Высокий неспецифический сигнал (фон)
Высокая чувствительность	Гашение флуоресцентного сигнала
Совместимость с объектами разных типов	Сложность оптимизации
Мультиплексирование	Высокая стоимость

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 не прямой 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 авторы 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. (Atjakshin 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 H. 2020. Multiplex immunofluorescence assays. *Methods Mol. Biol.* V. 2055. P. 467.
- Foster H.A., Sturmeijer 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.
- Larracuenta 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. 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. *Bio-techniques.* 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., Minzhenskova 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