

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych *in situ*: od ISH do DIRVISH

Jolanta Matuszyńska

Katedra Anatomii i Cytologii
Uniwersytet Śląski
Katowice

1. Wprowadzenie

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych *in situ* (ISH) polega na łączeniu znakowanego polinukleotydu zwanego sondą z komplementarnymi sekwencjami kwasów nukleinowych w komórce. Metoda ta pozwala na wykrywanie i lokalizację specyficznych sekwencji DNA lub RNA w komórce, jądrze lub chromosomach. Dała ona początek cytogenetyce molekularnej przez łączne zastosowanie technik biologii molekularnej i cytogenetyki.

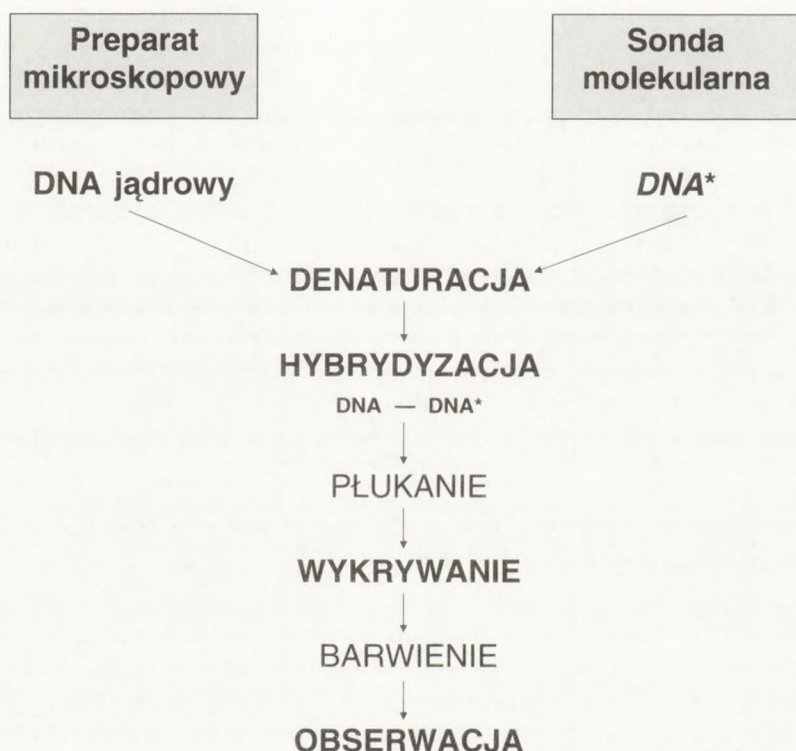
Hybrydyzacja *in situ* została opisana, po raz pierwszy, w 1969 r. przez Pardue i Gall (1). Jako sondę stosowano wtedy DNA znakowane izotopem, a miejsca hybrydyzacji wykrywano autoradiograficznie. Na początku stosowano tę metodę do lokalizacji powtarzających się sekwencji DNA w chromosomach roślinnych i zwierzęcych. Po udoskonaleniu procedury stało się możliwe wykorzystanie ISH do mapowania sekwencji unikatowych. Mimo wysokiej czułości, radioaktywna ISH ma wiele wad. Po pierwsze, czas ekspozycji, często kilkutygodniowy, wydłuża znacznie trwanie eksperymentu. Po drugie, pracochłonne liczenie ziaren srebra, w celu odróżnienia sygnałów specyficznej hybrydyzacji od ziarnistości tła sprawiły, że opisana przez Bauman i współ. (2) w 1980 r. metoda nieradioaktywnej hybrydyzacji *in situ* znalazła szybko wielu zwolenników.

Metoda nieradioaktywnej ISH polegająca na znakowaniu sondy najczęściej naturalnymi heptanami, biotyną (witamina) lub digoksygeniną (steroid izolowany z rośliny *Digitalis purpurea*), a następnie wykrywaniu hybrydowego DNA immunocytochemicznie, ulegała wielu modyfikacjom. Dzięki dostarczaniu przez firmy coraz nowszych przeciwciał połączonych z różnymi fluorochromami oraz udoskonaleniu mikroskopów fluorescencyjnych, szczególnie szerokie zastosowanie znalazła metoda immunofluorescencyjnego wykrywania miejsc hybrydyzacji, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH).

FISH znajduje coraz szersze zastosowanie w genetyce i hodowli roślin, w badaniach dotyczących organizacji genomu i cytotaksonomii molekularnej. Na szczególne podkreślenie zasługuje wykorzystanie FISH w medycynie zarówno w badaniach podstawowych jak i klinicznych. W dalszej części artykułu przedstawiono wykorzystanie również innych technik fluorescencyjnej DNA-DNA hybrydyzacji *in situ* do lokalizacji sekwencji DNA w chromosomach i jądrach interfazowych, głównie komórek roślinnych.

2. Metoda FISH

Hybrydyzacja *in situ* może być prowadzona na rutynowo wykonanych preparatach, zgniatanych, rozmazowych, skrawkach parafinowych i eponowych. Materiał musi być jednak tak przygotowany, aby zapobiegał utracie DNA, zachowywał strukturę jądra i chromosomów oraz umożliwiał swobodne przenikanie sondy (rys.1).



Rys. 1. Schemat przebiegu hybrydyzacji DNA-DNA *in situ*. DNA* oznacza sondę znakowaną biotyną, digoksygeniną lub innym nieradioaktywnym znacznikiem.

DNA, służący jako sonda, może być znakowany z wykorzystaniem enzymu DNA polimerazy/DNazy (*nick translation*), Klenow DNA polimerazy (*random priming*) lub telomerazy (*end labelling*). Ostatnio wykorzystuje się również do tego celu łańcuchową reakcję polimerazową (PCR). Najczęściej do znakowania używa się nukleotydy połączone z fluorochromem (fluorescein-11-dUTP), biotyną (biotin-11-UTP) lub digoksygeniną (digoxigenin-11-UTP). Pełne zestawy odczynników potrzebnych do przeprowadzenia reakcji są dostarczane przez wiele firm, np. Amersham International, Boehringer Mannheim lub BRL Life Technologies.

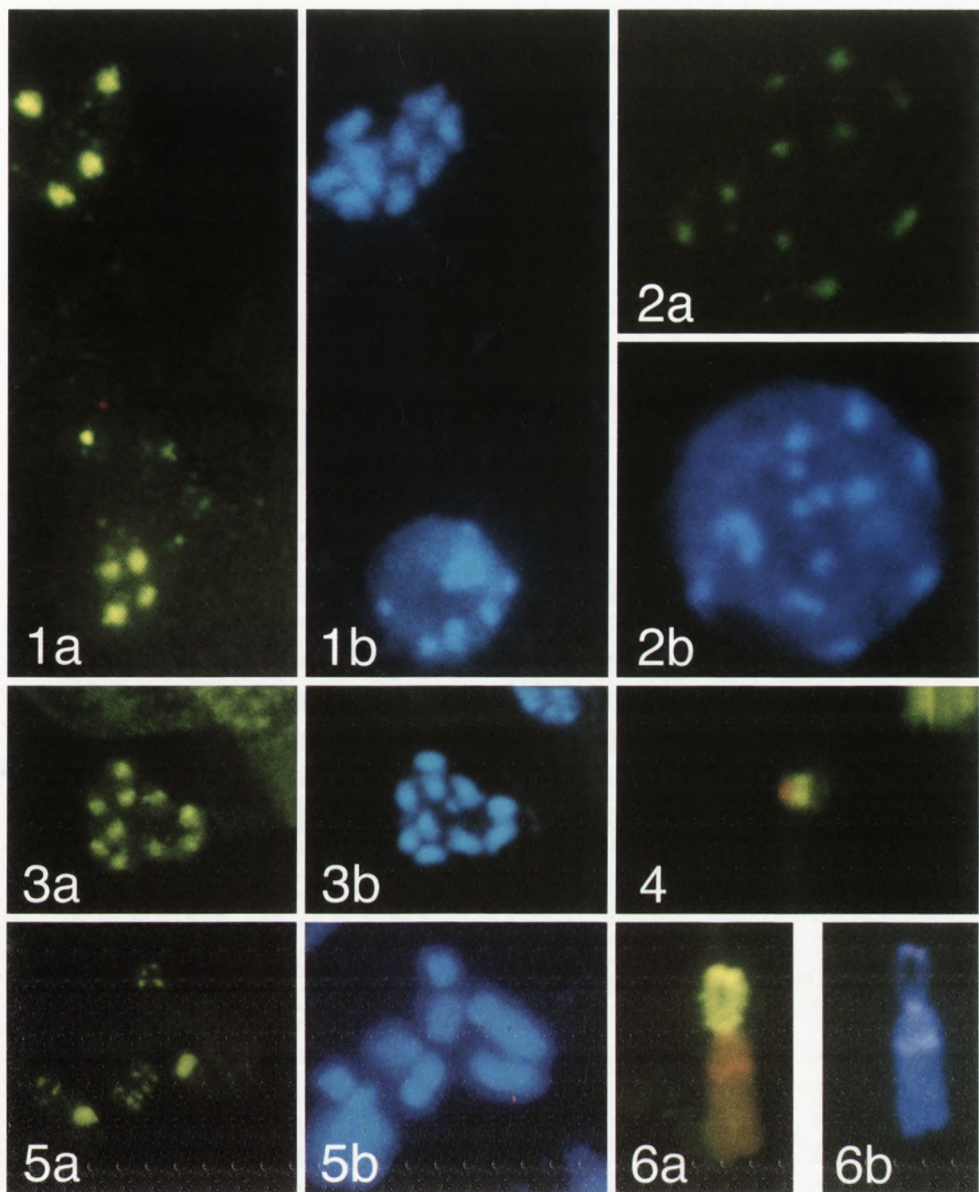
W celu przeprowadzenia hybrydyzacji, zdenaturowaną sondę umieszcza się na preparacie zawierającym uprzednio zdenaturowane chromosomy i inkubuje przez 12-16 godzin w 37°C. Warunki hybrydyzacji i posthybrydyzacyjnego płukania pozwalają optymalizować specyficzną hybrydyzację oraz usuwać niespecyficzne hybrydy, które są mniej stabilne, a tym samym zmniejszać niepożądane tło.

W zależności od rodzaju znakowania sondy, miejsca hybrydyzacji można obserwować bądź bezpośrednio w mikroskopie fluorescencyjnym, następuje to w przypadku znakowania fluorochromem, bądź dopiero po immunochemicznym wykryciu znaczników, takich jak biotyna lub digoksygenina. Do wykrywania biotyny stosuje się zwykle avidynę lub streptoawidynę, do wykrywania digoksygeniny przeciwciała, antydigoksygeninę, połączone z różnymi fluorochromami (FITC — *fluorescein isothiocyanate*; rodamina; Texas Red itp). Sygnały fluorescencji w miejscach hybrydyzacji obserwuje się w epifluorescencyjnym mikroskopie wyposażonym w odpowiedni zestaw filtrów (fot. 1-6).

Możliwe jest równoczesne stosowanie dwóch lub więcej sond, odmiennie znakowanych i następnie wykrywanych z użyciem różnych fluorochromów. Specjalne filtry pozwalają na równoczesną obserwację różnej fluorescencji (fot. 4) (3, 4, 5). Obraz mikroskopowy może być fotografowany lub przekazany do pamięci komputera za pomocą CCD kamery (*charge coupland device*) albo mikroskopu konfokalnego. Szegółowe opisy metody *in situ* hybrydyzacji można znaleźć w wielu oryginalnych publikacjach jak i specjalnych opracowaniach (6, 7) czy też broszurach wydawanych przez firmy komercyjne (np. Boehringer Mannheim).

3. Zastosowanie FISH

Możliwość lokalizacji sekwencji DNA w chromosomach roślinnych na drodze hybrydyzacji *in situ* ma coraz większe znaczenie w różnych działach biologii molekularnej. ISH nie tylko dostarcza informacji o pozycji określonych genów lub sekwencji DNA, ale również o wzajemnym ich położeniu w chromosomie czy nawet w jądrze intrefazowym. Daje to możliwość porównania map fizycznych chromosomów z mapami genetycznymi (8), określenia związków między badaną sekwencją DNA a strukturą genomu i aktywnością genów (9, 10). Sekwencje DNA, które zostały zmapowane na drodze ISH obejmują



Fot. 1-6. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*. Na zdjęciach a i b przedstawiono ten sam obiekt; a — fluorescencja FITC (*fluorescein isothiocyanate*) w miejscach hybrydyzacji, b — niebieska fluorescencja DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) barwiąca całość DNA. Powiększenie: Fot. 1-4 i 6 — 3000x; Fot. 5 — 2000x.

1. Lokalizacja rDNA w chromosomach metafazowych i jądrze interfazowym *Arabidopsis thaliana*, widoczne cztery loci rRNA genów. rDNA znakowane biotyną, wykrywanie avidyną połączoną z fluorochromem FITC.

2-3. Lokalizacja centromerowego DNA (sonda pAL1 znakowana digoksygeniną) w jądrze interfazowym (2) i chromosomach metafazowych (3) *Arabidopsis thaliana*, wykrywanie antydigoksygeniną połączoną z FITC. Na obu zdjęciach uwidoczniło się dziesięć sygnałów fluorescencji w miejscach hybrydyzacji.

4. Podwójna hybrydyzacja *in situ* w pojedynczym chromosomie *Arabidopsis thaliana*. Jako sondę zastosowano rDNA znakowany biotyną i wykrywany avidyną-Texas red (pomarańczowa fluorescencja) i centromerowy DNA, pAL1, znakowany digoksygeniną i wykrywane antydigoksygeniną — FITC (żółta fluorescencja).

5. Wykrywanie genów rRNA w B chromosomach *Crepis capillaris*. rDNA znakowany biotyną hybrydyzuje z DNA w jednej parze chromosomów standardowych (większe sygnały fluorescencji) i z DNA w chromosomach B. Widoczne we wszystkich czterech chromosomach B żółte punkty fluorescencji FITC odpowiadają położeniu genów rRNA.

6. Pojedynczy chromosom *Crepis capillaris* z organizatorem jąderka (NOR). Żółta fluorescencja, po hybrydyzacji *in situ*, odpowiada położeniu rDNA. Pomarańczowa fluorescencja długiego ramienia jest wynikiem barwienia bromkiem etidium.

geny powtarzalne i unikatowe jak również sekwencje nietranskrybowane, występujące tandemowo lub rozproszone.

Lokalizacja sekwencji powtarzających się, szczególnie typu tandem, jest znacznie łatwiejsza niż sekwencji występujących w jednej lub kilku kopiach. Jest jednak kilka doniesień o lokalizacji unikatowych sekwencji w chromosomach roślinnych (11, 12, 13, 14). Nasuwa się pytanie jak długie odcinki DNA mogą być wykrywane na drodze hybrydyzacji *in situ*. Przy obecnej czułości metody, możliwe jest wykrywanie pojedynczych sekwencji o długości około 10 kb w chromosomach roślinnych (14) i 2,5-5 kb, a czasem mniejszych w chromosomach człowieka (15).

Dla sekwencji lub genów powtarzających się, hybrydyzacja *in situ*, jak się wydaje, jest najlepszą metodą do ich mapowania. Geny rybosomalnego RNA występują w genomie roślinnym w setkach lub nawet tysiącach kopii, w jednym lub kilku loci związanych z regionem organizatora jąderka (NOR) (fot. 6). Stosując jako sondę rDNA (geny kodujące 18S-5,8S-26S rRNA) wykryto i zlokalizowano geny rRNA u wielu gatunków roślin, takich jak: pszenica (16), soja (17), jęczmień (18), cebula (19), tytoń (20), ryż (21). W wielu przypadkach, szczególnie u gatunków z małymi chromosomami, gdzie tradycyjne metody cytogenetyczne zawodzą, była to jedyna droga ustalenia liczby i pozycji rDNA. Do takich gatunków należy przede wszystkim *Arabidopsis thaliana*, modelowa roślina w biologii molekularnej i genetyce roślin, u której zlokalizowano geny rRNA w dwóch parach chromosomów (fot. 1) (4). Podobnie ustalono liczbę rRNA loci u trzech innych gatunków z rodzaju *Arabidopsis* (22). FISH pozwoliła wykryć obecność genów rybosomalnego RNA nie tylko w chromosomach standardowych *Crepis capillaris*, ale również w chromosomach dodatkowych zwanych chromosomami B (fot. 5, 6) (23).

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych *in situ* stanowi pożądane uzupełnienie wyników badań molekularnych, tak konieczne dla pełniejszego zrozumienia struktury genomu. Na przykład, na podstawie Southern hybrydyzacji, ustalono całkowitą liczbę kopii rDNA u diploidalnych i amfidiploidalnych gatunków rodzaju *Brassica* (24). Zastosowanie FISH pozwoliło ustalić liczbę loci rDNA u poszczególnych gatunków i dostarczyło dodatkowych danych o przemianach chromosomowych w czasie ewolucji tych gatunków (25). Na drodze hybrydyzacji *in situ* wykazano, że wyizolowane z jęczmienia, powtarzające się sekwencje BIS1 typu retrotranspozon, są rozproszone wzdłuż chromosomów z wyjątkiem odcinków centromerowych, telomerowych i organizatora jąderka (26). Podobnie, wyizolowana z *Arabidopsis thaliana* i scharakteryzowana molekularnie powtarzająca się sekwencja pAL1 (27), została zlokalizowana na drodze hybrydyzacji *in situ* w centromerowych odcinkach wszystkich dziesięciu chromosomów tego gatunku (fot. 2, 3) (4).

Sygnaly hybrydyzacji *in situ* mogą być znakomitym markerem poszczególnych chromosomów, szczególnie gdy różnice morfologiczne między nimi są niewielkie. Daje to możliwość identyfikacji chromosomów w zmienionym czy mieszańcowym kariotypie, liniach translokacyjnych czy substytucyjnych (28, 29). Wyjątkową zaletą tej techniki jest możliwość lokalizacji sekwencji DNA

w jądrach interfazowych, a tym samym, identyfikacji i śledzenia położenia danego chromosomu w nie dzielącym się jądrze. Na przykład, hybrydyzacja centromerowego DNA w jądrach *Arabidopsis*, pozwala określić poliploidalność roślin bez konieczności otrzymania dobrych metafazowych chromosomów (4) (fot. 3a).

„Cytogenetyka jądra interfazowego” otworzyła nowe możliwości badania struktury i organizacji przestrzennej jądra komórkowego. Badania wzajemnego ułożenia chromosomów w okresie kiedy są one zdekondensowane, ale mają największą aktywność transkrypcyjną, powinny przyczynić się do pełniejszego zrozumienia funkcjonowania genomu i jego uzależnień od architektury jądra (10, 30). Najczęściej stosowaną w tych badaniach techniką jest lokalizacja sekwencji DNA w trójwymiarowej rekonstrukcji jądra komórkowego. Komputerowa rekonstrukcja sporządzana jest na podstawie kolejnych skrawków mikrotomowych jądra komórkowego (31) bądź jego przekrojów optycznych otrzymanych za pomocą mikroskopu konfokalnego (32, 33, 34).

Znaczną część genomu roślinnego stanowią sekwencje niekodujące zawarte głównie w heterochromatynie. Wiele tych sekwencji pełni funkcje strukturalne. Jedną z najlepiej molekularnie scharakteryzowanych takich sekwencji jest DNA telomerowe, zbudowane z krótkich odcinków (6-7 par zasad), powtarzających się tandemowo kilkaset razy i stanowiących fizyczny koniec każdego chromosomu. Telomerowe sekwencje zostały zlokalizowane, na drodze FISH, u kilku gatunków roślin (35, 36). Okazało się, że sekwencje te mogą również występować w przycentromerowych i interstycjalnych odcinkach niektórych chromosomów (37, 38), co może odzwierciedlać wcześniejsze przemiany strukturalne u tych gatunków, np. fuzję chromosomów telocentrycznych.

Innym przykładem nietranskrybowanej, powtarzającej się sekwencji, jest DNA — pSc119 — wyizolowany z żyta (39). Sekwencja ta była zlokalizowana w mitotycznych (3), a następnie mejotycznych chromosomach żyta (40). Przez wielu autorów klon pSc119 jest wykorzystywany jako marker chromosomów żyta i używany do ich wykrywania w genomie pszenicy (28, 29).

Pozytywny wynik transformacji roślin, uzyskiwanej stosując różne metody, jest zwykle ustalany na podstawie ekspresji wprowadzonych genów, np. oporności na antybiotyki czy genów reporterowych, jak β -glukuronidazy (GUS) lub lucyferazy. Na tej podstawie nie można jednak wnioskować o lokalizacji „obcego DNA” w transformowanym genomie. Uważa się, że hybrydyzacja *in situ* stanowi jedyną obecnie metodę umożliwiającą genomową lokalizację zainkorporowanego DNA. Nieradioaktywna ISH (sonda znakowana biotyną) została z powodzeniem zastosowana do potwierdzenia transformacji i identyfikacji miejsca inkorporacji T-DNA w chromosomach korzeni *Crepis capillaris*, otrzymanych w wyniku transformacji za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* (11). Prace dotyczące lokalizacji T-DNA lub genu oporności na kanamycynę, wprowadzonego na drodze bezpośredniej transformacji, były wcześniej przeprowadzone na transformowanych roślinach tytoniu metodą radioaktywnej hybrydyzacji *in situ* (41, 42). Podobnie, stosując *in situ* hybrydyzację do określenia liczby sekwencji kodujących leghemoglobinę w brodawkach korzeniowych *Lu-*

pinus luteus, stwierdzono większą liczbę miejsc hybrydyzacji w jądrach komórek brodawkowych niż w niezainfekowanych komórkach korzenia. Na podstawie tych badań przypuszcza się występowanie, indukowanej przez bakteroid, amplifikacji genu leghemoglobiny (43).

4. Genomowa hybrydyzacja *in situ* — GISH

Genomowa hybrydyzacja *in situ* jest metodą, w której jako sondę do hybrydyzacji używa się całkowity genomowy DNA określonego gatunku (np. AA). Umożliwia ona identyfikację chromosomów danego gatunku (A) w mieszańcach międzygatunkowych czy gatunkach allopoliploidalnych (np. AABB). Specyficzność genomowej hybrydyzacji można zwiększyć przez użycie nieznakowanego genomowego DNA, pochodzącego z drugiego gatunku (BB) jako blokującego (*competitor*) DNA. Nieznakowany DNA znacznie szybciej hybrydyzuje z chromosomami dawcy (B) niż znakowany DNA pochodzący od drugiego gatunku (44, 45). Używając genomowy DNA żyta do hybrydyzacji z chromosomami heksaploidalnego pszenżyta odmiany Lasko, można było łatwo odróżnić chromosomy dwóch rodzicielskich gatunków, żyta i pszenicy (46). Stosując genomowy DNA *Nicotiana sylvestris* rozróżniono chromosomy obu ancestralnych genomów amfidiploidalnego gatunku *Nicotiana tabacum* (20), czy używając genomowy DNA *Brassica campestris* wyróżniono chromosomy pochodzące od tego gatunku w genomie *Brassica juncea* (Małuszyńska, dane nie publikowane).

GISH pozwala nie tylko odróżniać rodzicielskie genomy mieszańców, ale również śledzić ich zachowanie się w jądrach interfazowych i w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Genomy rodzicielskie mieszańca międzygatunkowego, *Hordeum vulgare* x *Secale africanum*, zostały zidentyfikowane na drodze hybrydyzacji *in situ* z genomowym DNA *S. africanum*. Trójwymiarowa rekonstrukcja jądra, na podstawie skrawków mikrotomowych komórek merystematycznych korzeni po hybrydyzacji *in situ*, pozwoliła zanalizować wzajemne położenie genomów w jądrze interfazowym mieszańca (31, 44). Podobnie hybrydyzacja *in situ* z genomowym DNA *Hordeum bulbosum* pozwoliła zaobserwować zachowanie się genomów rodzicielskich w krzyżówce *H. vulgare* x *H. bulbosum*, tak często używanej do otrzymywania haploidów jęczmienia (47). W obu przypadkach, genomy rodzicielskie zachowywały swoją odrębność i wykazywały, przez cały cykl mitotyczny, specyficzną separację. Badania te dostarczają nowych danych o nieprzypadkowym położeniu chromosomów w jądrze i wnoszą istotny wkład w zrozumienie architektury i organizacji jądra komórkowego.

Innym zastosowaniem GISH, mającej również istotne znaczenie w badaniach genetycznych i hodowli roślin, jest identyfikacja i lokalizacja pojedynczych chromosomów lub ich fragmentów występujących w obcym genomie. W wyniku hybrydyzacji poszukiwany chromosom wyróżnia się od pozostałych jasną fluorescencją, jak byłby pomalowany, stąd określenie dla tej metody *chromosome painting*.

Wiele ważnych, z punktu widzenia hodowli roślin, genów odporności na choroby czy warunki stresowe występuje u dzikich gatunków. Geny te mogą być przenieszone do genomu odmian uprawnych wraz z całym chromosomem lub jego fragmentem na drodze krzyżowania. Niektóre odmiany uprawne pszenicy zawierają translokację segmentu chromosomu żyta 1R w długim ramieniu chromosomu 1B pszenicy (1B/1R). Stosując konwencjonalne metody cytogenetyczne trudno jest ustalić występowanie tej translokacji. Zastosowanie hybrydyzacji *in situ* z genomowym DNA żyta pozwala na identyfikację translokacji oraz dokładne ustalenie punktu pęknięcia chromosomu (48). GISH była stosowana w badaniach wielu odmian pszenicy zawierających różne translokacje z dzikich gatunków roślin zbożowych (49, 50). Należy podkreślić, że metoda ta umożliwiła wykrycie obcego chromosomu lub odcinka chromosomu badanego genomu, również w jądrach interfazowych. Metoda genomowej hybrydyzacji *in situ* jest szybka i bardzo precyzyjna, a przez to przydatna zarówno w cytogenetycznych badaniach podstawowych jak i w programach hodowli roślin.

5. PRINS i PCR-PRINS

PRINS (*PRImed IN Situ labeling*) jest to metoda, która wykorzystuje łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) do wykrywania kwasów nukleinowych *in situ* (51). Polega ona na łączeniu nieznakowanych oligonukleotydów, pełniących funkcję starterów, ze zdenaturowanym DNA chromosomów i następnie ich inkubacji z mieszaniną zawierającą znakowane nukleotydy i polimerazę DNA (Klenow lub *TaqI*). Podczas inkubacji następuje specyficzna synteza nowego odcinka DNA, który zawiera znakowane nukleotydy i może być wykryty jak w tradycyjnej metodzie *in situ* hybrydyzacji (52).

Metoda ta ma kilka zalet w porównaniu do konwencjonalnej hybrydyzacji *in situ*. Procedura jest znacznie krótsza. Sygnały hybrydyzacji są większe gdyż nowo zsyntetyzowane, znakowane odcinki DNA mogą być dłuższe niż poszukiwane sekwencje, a tym samym, większa czułość metody. Również niespecyficzne tło na preparacie jest znacznie mniejsze. PRINS znalazła zastosowanie w cytogenetyce człowieka znacznie ułatwiając mapowanie genów (53). Są też pierwsze próby wykorzystania tej metody do sporządzania fizycznych map chromosomów roślinnych (54).

Łańcuchowa reakcja polimerazy została jeszcze bardziej wykorzystana w ostatnio opracowanej metodzie PCR-PRINS, gdzie preparaty chromosomowe na miniaturowych szkiełkach mikroskopowych umieszcza się w probówkach z mieszaniną hybrydyzacyjną i inkubuje w urządzeniu do PCR. W kolejnych cyklach reakcji następuje amplifikacja, z równoczesnym znakowaniem, poszukiwanej sekwencji DNA, która jest następnie wykrywana jak w innych metodach hybrydyzacji *in situ* (55). Metoda ta jest szczególnie przydatna do lokalizacji krótkich sekwencji, występujących w pojedynczych kopiach (56) lub do wykrywania nawet pojedynczych kopii obcego DNA, np. wirusa (57).

Jest to możliwe przez akumulację amplifikowanego, specyficznie znakowanego DNA.

6. DIRVISH

DIRVISH (*DIRect VISual Hybridization*) daje nowe możliwości mapowania sekwencji DNA w chromosomach i jądrach interfazowych. W metodzie tej wykorzystuje się to, że DNA w formie zdespiralizowanej (*relaxed duplex*) osiąga długość, która może być obserwowana w mikroskopie świetlnym (np. 5kz może osiągnąć długość 1,7 μ m). Z taką nicią DNA, „rozciągniętą” na preparacie mikroskopowym, hybryduje następnie znakowana sonda. Tak zatem prowadząc hybrydyzację ze zdekondensowanym DNA, zwiększa się znacznie rozdzielczość mapowanych sekwencji. Z zastosowaniem tej metody zmapowano równocześnie kilka *cosmid* lub YAC klonów w chromosomach zwierzęcych (58).

Literatura

1. Pardue M.L., Gall J.G., (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 600-604.
2. Bauman J.G.J., Wiegant J., Borst P., van Duijn P., (1980), Exp. Cell Res., 128, 485-490.
3. Leitch I.J., Leitch A.R., Heslop-Harrison J.S., (1991), Genome, 34, 329-333.
4. Małuszyńska J., Heslop-Harrison J.S., (1991), The Plant J., 1(2), 159-166.
5. Mukai Y., Nakahara Y., Yamamoto M., (1993), Genome, 36, 489-494.
6. Małuszyńska J., Heslop-Harrison J.S., (1992), *EMBO/EEC Advanced Practical Laboratory Course on Arabidopsis Molecular Genetics*, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Cologne, 10-18
7. Leitch, A.R., Schwarbacher T., Jackson D., Leitch I.J. (1994). *In situ hybridization: a practical approach*, RMS Microscopy Handbook, vol. 27, Bios Scientific Publishers, Oxford.
8. Gustafson J.P., Butler E., McIntyre C.L., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 1899-1902.
9. Heslop-Harrison J.S., (1991), J. Cell Sci., 100, 15-21.
10. Leitch A.R., Mosgoller W., Shi M., Heslop-Harrison J.S., (1992), J. Cell Sci., 101, 751-757.
11. Ambros P.F., Matzke M.A., Matzke A.J.M., (1986), Chromosoma, 94, 11-18.
12. Gustafson J.P., Dille J.E., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8646-8650.
13. Lehler H., Busch W., Martin R., Herrmann R.G., (1993), Chromosoma, 102, 428-432.
14. Leitch I.J., Heslop-Harrison J.S., (1993), Genome, 36, 517-523.
15. Gosden J.R. Lawson D., (1994), *Chromosome Analysis Protocols*, Ed. Gosden J.R., Humana Press, Totowa, New Jersey, 323-333.
16. Mukai Y., Endo T.R., Gill B.S., (1991), Chromosoma, 100, 71-78.
17. Griffor M.C., Vodkin L.O., Singh R.J., Hymowitz T., (1991), Plant Mol. Biol., 17, 101-109.
18. Leitch I.J., Heslop-Harrison J.S., (1992), Genome, 35, 1013-1018.
19. Ricoch A., Peffley E.B., Baker R.J., (1992), Theor. Appl. Genet., 83, 413-418.
20. Kenton A., Parokony A.S., Gleba Y.Y., Bennett M.D., (1993), Mol. Gen. Genet., 240, 159-169.
21. Fukui K., Ohmido N., Khush G.S., (1994), Theor. Appl. Genet., 87, 893-899.
22. Małuszyńska J., Heslop-Harrison J.S., (1993), Ann. Bot., 71, 479-484.
23. Małuszyńska J., Schweitzer D., (1993), 1st B-Chromosome Conference, 52, Universidad Autonoma, Madrid.

24. Bennett R.I., Smith A.G., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 1095-1098.
25. Małuszyńska J., Heslop-Harrison J.S., (1993), *Genome*, 36, 774-781.
26. Moore G., Cheung W., Schwarzacher T., Flavell R., (1991), *Genomics*, 10, 469-476.
27. Martinez-Zapater J.M., Estelle M.A., Somerville C.R., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 204, 417-423.
28. Lapitan N.L.V., Sears R.G., Rayburn A.L., Gill B.S., (1986), *J. Hered.*, 77, 415-419.
29. Nkongolo K.K., Lapitan N.L.V., Quick J.S., Muhlmann M.D., (1993), *Genome*, 36, 701-705.
30. Bauwens S., van Oostveldt P., Engler G., van Montagu M., (1991), *Chromosoma*, 101, 41-48.
31. Leitch A.R., Schwarzacher T., Mosgoller W., Bennett M.D., Heslop-Harrison J.S., (1991), *Chromosoma*, 101, 206-213.
32. Dekken H., Bauman J.G.J., (1990), *Cytometry*, 11, 579-585.
33. Rawlins D.J., Shaw P.J., (1990), *Chromosoma*, 99, 143-151.
34. Rawlins D.J., Highett I.M., Shaw P.J., (1991), *Chromosoma*, 100, 424-431.
35. Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S., (1991), *Genome*, 34, 317-323.
36. Werner J.E., Kota R.S., Gill B.S., Endo T.R., (1992), *Genome*, 35, 844-848.
37. Schubert I., (1992), *Biol. Zentralbl.*, 111, 164-168.
38. Cox A.V., Bennett S.T., Parokony A.S., Kenton A., Callimassia M.A., Bennett M.D., (1993), *Ann. Bot.*, 72, 239-247.
39. Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.D., Flavell R.B., (1980), *Cell*, 19, 545-560.
40. Albin S.M., Schwarzacher T., (1992), *Genome*, 35, 551-559.
41. Mouras A., Saul M.W., Essad S., Potrykus I., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 207, 204-209.
42. Mouras A., Negrutiu I., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 715-720.
43. Olszewska M.J., Kononowicz A.K., Maszewski J., Mądrzak C.J., Konieczny A., Legocki A.B., (1989), *Biol. Zentralbl.*, 108, 231-239.
44. Schwarzacher T., Leitch A.R., Bennett M.D., Heslop-Harrison J.S., (1989), *Ann. Bot.*, 64, 315-324.
45. Ananthawat-Jonsson K., Schwarzacher T., Leitch A.R., Bennett M.D., Heslop-Harrison J.S., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 79, 721-728.
46. Heslop-Harrison J.S., Schwarzacher T., (1993), *Chromosomes Today*, 11, 191-198.
47. Ananthawat-Jonsson K., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S., (1993), *J. Hered.*, 84, 78-82.
48. Heslop-Harrison J.S., Leitch A.R., Schwarzacher T., Ananthawat-Jonsson K., (1990), *Heredity*, 65, 385-392.
49. Schwarzacher T., Ananthawat-Jonsson K., Harrison G.E., Islam A.K.M.R., Jia J.Z., King I.P., Leitch A.R., Miller T.E., Reader S.M., Rogers W.J., Shi M., Heslop-Harrison J.S., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 84, 778-786.
50. Friebe B., Jiang J., Gill B.S., Dyck P.L., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 141-149.
51. Koch J., Kolvrå S., Peterson K.B., Gregersen N., Boulund L., (1989), *Chromosoma*, 98, 259-265.
52. Koch J., Mogensen J., Pedersen S., Fischer H., Hindkjaer J., Kolvrå S., Bolund L., (1992), *Cytogenet. Cell Genet.*, 60, 1-3.
53. Gosden J., Hanratty D., Starling J., Fantes J., Mitchell A., Porteous D., (1991), *Cytogenet. Cell Genet.*, 57, 100-104.
54. Abbo S., Miller T.E., King I.P., (1993), *Genome*, 36, 815-817.
55. Gosden J., Hanratty D., (1993), *BioTechniques*, 15, 78-80.
56. Terkelsen C., Koch J., Kolvrå S., Hindkjaer J., Pedersen S., Bolund L., (1993), *Cytogenet. Cell Genet.*, 63, 235-237.
57. Bagasra O., Seshamma T., Pomerantz R.J., (1993), *Journal of Immunological Methods*, 158, 131-145.
58. Parra I., Windle B., (1993), *Nature Genet.*, 5, 17-21.

Nucleic acid *in situ* hybridization: from ISH to DIRVISH**Summary**

In situ hybridization (ISH) provides a highly sensitive method for the detection of specific nucleic acid sequences in cells, nuclei and metaphase chromosomes. This technique has been improved continuously since it was first established in 1969. Especially fluorescent *in situ* hybridization (FISH) rapidly replaced radioactive procedures and became a conventional tool in cytogenetic research. ISH plays an increasingly important role in a variety of research areas of medicine, genetics and plant breeding. It has been successfully applied for chromosome or chromosome fragments identification, chromosomal abnormalities detection, gene mapping or specific DNA sequences localization.

Key words:

molekular cytogenetics, chromosom, fluorescent, *in situ*, hybridization, gene mapping.

Adres dla korespondencji:

Jolanta Małuszyńska, Katedra Anatomii i Cytologii, Uniwersytet Śląski,
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice.