

Pregled metoda u staničnoj genetici

Velić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:946270>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREGLED METODA U STANIČNOJ GENETICI
ZAVRŠNI RAD

MARINA VELIĆ

Matični broj: 57

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE
TEHNOLOGIJE

PREGLED METODA U STANIČNOJ GENETICI

ZAVRŠNI RAD

MARINA VELIĆ

Matični broj:57

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

A REVIEW OF METHODS IN CELL GENETICS

BACHELOR THESIS

MARINA VELIĆ

Parent number: 57

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: Dr.sc. Ivana Carev

Pomoć pri izradi: Dr. sc. Ivana Carev

PREGLED METODA U STANIČNOJ GENETICI

Marina Velić, 57

Sažetak: Genetika je mlada znanost koja se bavi proučavanjem zakonitosti nasljeđivanja, sličnosti i različitosti živih organizama. Genetika proučava strukturu i funkciju gena, nasljeđivanje gena, promjene koje se događaju u organizmima i mnoge uzročnike bolesti. Citogenetika je grana genetike koja proučava stanične strukture koje su odgovorne za nasljeđivanje. Tako ona istražuje građu i broj kromosoma, smještaj gena i mutacije. Cilj ovog rada bio je opisati metode u staničnoj genetici, citogenetici. U radu su detaljno opisane metode protočne citometrije i metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH). Protočna citometrija je metoda koja omogućava brzu, osjetljivu i točnu analizu velikog broja staničnih komponenti. Ona se koristi za izolaciju specifičnih stanica ili staničnih jezgri iz smjese stanica na osnovu različitog raspršivanja svjetlosti, odnosno fluorescencije. Upravo fluorescencija razdvaja stanice koje su obilježene različitim fluorescentnim reagensima. Fluorescentna *in situ* hibridizacija je tehnika koja uz pomoć nukleinske sonde, odnosno probe, uočava određenu sekvencu u kromosomu. Sonda predstavlja fluorescentno označenu molekulu DNA koja je komplementarna sekvenci genoma kojeg treba otkriti. Tako je ovom tehnikom moguće čitave kromosome predstaviti u bojama. Metoda FISH upotrebljava se za identificiranje gena, dijelova gena, kromosoma i za otkrivanje pojedinih promjena u kromosomima.

Ključne riječi: genetika, metoda protočne citometrije, fluorescentna *in situ* hibridizacija

Rad sadrži: 29 stranica, 17 slika, 1 tablicu, 39 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Mila Radan – predsjednik
2. Prof. dr. sc. Mladen Miloš – član
3. Dr. sc. Ivana Carev-mentor

Datum obrane: 21. rujan 2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study Food Technology

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28.

Mentor: Ivana Carev, PhD

Technical assistance: Ivana Carev, PhD

A REVIEW OF METHODS IN CELL GENETICS

Marina Velić, 57

Abstract: Genetics is a young science that deals with the study of the laws of inheritance, similarities and differences of living organisms. Genetics studies the structure and function of genes, gene inheritance, changes that occur in organisms, and many pathogens. Cytogenetics is a branch of genetics that studies cellular structures responsible for inheritance. Thus, she investigates the structure and number of chromosomes, gene placement and mutations. The aim of this work was to describe methods in cellular genetics, cytogenetics. This work describes the flow cytometry method and the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method. Flow cytometry is a technique that allows fast, sensitive and accurate analysis of a large number of cellular components. It is used to isolate specific cells or cell nuclei from a mixture of cells based on different light scattering or fluorescence. Fluorescent *in situ* hybridization is a technique that uses a nucleic to detect a specific sequence in a chromosome. The probe is a fluorescently labeled DNA molecule that is complementary to the sequence of the genome to be detected. Thus, with this technique, it is possible to present entire chromosomes in colors. The FISH method is used to identify genes, parts of genes, chromosomes and to detect individual changes in chromosomes.

Keywords: genetics, flow cytometry method, fluorescent *in situ* hybridization

Thesis contains: 29 pages, 17 figures, 1 table, 39 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Mila Radan, PhD, associate prof., chair person
2. Mladen Miloš , PhD, full prof., member
3. Ivana Carev, PhD, supervisor

Defence date: 21. 09. 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom dr.sc. Ivane Carev, u razdoblju od ožujka do rujna 2020. godine.

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Ivani Carev na pomoći i stručnim savjetima pri izradi ovoga rada.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek vjerovali u mene i pružali mi podršku tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Definiranje metoda u citogenetici koje se koriste za istraživanja u biologiji i biokemiji
- Protočna citometrija i njene prednosti kao metode u citogenetici
- Fluorescentna *in situ* hibridizacija i njezine prednosti kao metode u citogenetici

SAŽETAK

Genetika je mlada znanost koja se bavi proučavanjem zakonitosti nasljeđivanja, sličnosti i različitosti živih organizama. Genetika proučava strukturu i funkciju gena, nasljeđivanje gena, promjene koje se događaju u organizmima i mnoge uzročnike bolesti.

Citogenetika je grana genetike koja proučava stanične strukture koje su odgovorne za nasljeđivanje. Tako ona istražuje građu i broj kromosoma, smještaj gena i mutacije.

Cilj ovog rada bio je opisati metode u staničnoj genetici, citogenetici.

U radu su detaljno opisane metode protočne citometrije i metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH).

Protočna citometrija je metoda koja omogućava brzu, osjetljivu i točnu analizu velikog broja staničnih komponenti. Ona se koristi za izolaciju specifičnih stanica ili staničnih jezgri iz smjese stanica na osnovu različitog raspršivanja svjetlosti, odnosno fluorescencije. Upravo fluorescencija razdvaja stanice koje su obilježene različitim fluorescentnim reagensima.

Fluorescentna *in situ* hibridizacija je tehnika koja uz pomoć nukleinske sonde, odnosno probe, uočava određenu sekvencu u kromosomu. Sonda predstavlja fluorescentno označenu molekulu DNA koja je komplementarna sekvenci genoma kojeg treba otkriti. Tako je ovom tehnikom moguće čitave kromosome predstaviti u bojama. Metoda FISH upotrebljava se za identificiranje gena, dijelova gena, kromosoma i za otkrivanje pojedinih promjena u kromosomima.

Ključne riječi: genetika, metoda protočne citometrije, fluorescentna *in situ* hibridizacija

SUMMARY

Genetics is a young science that deals with the study of the laws of inheritance, similarities and differences of living organisms. Genetics studies the structure and function of genes, gene inheritance, changes that occur in organisms, and many pathogens.

Cytogenetics is a branch of genetics that studies cellular structures responsible for inheritance. Thus, she investigates the structure and number of chromosomes, gene placement and mutations.

The aim of this work was to describe methods in cellular genetics, cytogenetics.

This work describes the flow cytometry method and the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method.

Flow cytometry is a technique that allows fast, sensitive and accurate analysis of a large number of cellular components. It is used to isolate specific cells or cell nuclei from a mixture of cells based on different light scattering or fluorescence.

Fluorescent *in situ* hybridization is a technique that uses a nucleic to detect a specific sequence in a chromosome. The probe is a fluorescently labeled DNA molecule that is complementary to the sequence of the genome to be detected. Thus, with this technique, it is possible to present entire chromosomes in colors. The FISH method is used to identify genes, parts of genes, chromosomes and to detect individual changes in chromosomes.

Keywords: genetics, flow citometry method, fluorescent *in situ* hybridization

SADRŽAJ:

| | |
|---|----|
| UVOD..... | 1 |
| 1. OPĆI DIO..... | 2 |
| 1.1 UVOD U GENETIKU..... | 2 |
| 1.1.1 GENI..... | 2 |
| 1.1.2 KROMOSOMI..... | 3 |
| 1.1.3 STRUKTURA NUKLEINSKIH KISELINA..... | 4 |
| 1.1.4 POVIJEST GENETIKE..... | 5 |
| 1.1.5 VAŽNA OTKRIĆA U GENETICI..... | 5 |
| 1.2 JEDINSTVO I RAZNOLIKOST..... | 7 |
| 1.2.1 GENOTIP I FENOTIP..... | 8 |
| 2. PREGLED METODA U STANIČNOJ GENETICI..... | 10 |
| 2.1 PROTOČNA CITOMETRIJA..... | 11 |
| 2.1.1 POVIJEST PROTOČNE CITOMETRIJE..... | 11 |
| 2.1.2 DIJELOVI CITOMETRA..... | 12 |
| 2.1.3 OPTIKA I ELEKTRONIKA..... | 14 |
| 2.1.4 PRINCIP RADA..... | 14 |
| 2.1.5 PRIPREMA MATERIJALA ZA ANALIZU U PROTOČNOJ CITOMETRIJI..... | 15 |
| 2.1.6 FLUOROKROM..... | 17 |
| 2.2 FISH METODA- FLUORESCENTNA <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA..... | 19 |
| 2.2.1 PRINCIP RADA FISH METODE..... | 21 |
| 2.2.2 VRSTE SONDA/PROBA U FISH METODI..... | 23 |
| 3. RASPRAVA..... | 25 |
| 4. ZAKLJUČAK..... | 26 |
| 5. LITERATURA:..... | 27 |

UVOD

U genetici, pojam koji označava prenošenje genske informacije s roditelja na potomstvo, tijekom generacije, naziva se nasljeđivanje. Poprilično je rašireno pogrešno mišljenje da se generacijski nasljeđuju i osobine, no znamo kako se nasljeđuju geni, koji se pod utjecajem okoline ispoljavaju na potomstvu. Najvažnija osobina svih organizama je njihova posebnost, odnosno činjenica da niti jedna jedinka nije ista. Svaki organizam razvija se prema već određenom nacrtu koji je zapisan u genima, dok s druge strane svaki organizam ima neograničenu raznolikost u vidu ponašanja i svojih osobina. Spoj genetskih osobina i vanjskih utjecaja daju osnovu za evolucijske promjene i čine svaki organizam individualnim.

Napretkom tehnologije omogućena je identifikacija pojedinačnih kromosoma, razlikovanje jednog kromosoma od drugog, identifikacija gena i dijelova gena, te otkrivanje promjena u kromosomima koji su uzroci raznih bolesti.

U ovom su radu opisane dvije značajne metode koje se koriste u staničnoj genetici.

Metoda protočne citometrije (eng. flow cytometry; FCM) daje brzu i točnu analizu velikog broja staničnih komponenti. Glavna prednost ove metode su jednostavnost i brzina njene izvedbe. Protočna citometrija svoju je upotrebu pronašla u kliničkoj dijagnostici, biotehnologiji, genetici, molekularnoj biologiji, biologiji, farmakologiji i drugim sličnim istraživanjima.

Metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) temelji se na osnovnom načelu molekularne genetike, odnosno na hibridizaciji dviju komplementarnih sekvenci. Metoda koristi nukleinsku probu, odnosno sondu, kako bi uočila određenu sekvencu u kromosomu. Sonda predstavlja fluorescentno obilježenu molekulu DNA koja je komplementarna sekvenci genoma koji se treba detektirati.

1. OPĆI DIO

1.1 UVOD U GENETIKU

Genetika (od starog grčkog *genetikos*, genitiv od *genesis*, što znači “podrijetlo”), relativno je mlada znanost, a naziv “genetika” 1905. godine prvi put upotrijebio je William Bateson.

Genetika je znanost koja se bavi proučavanjem uzroka i zakonitosti nasljeđivanja kod živih bića, njihovih međusobnih sličnosti i različitosti. Bavi se strukturom i funkcijom gena, ponašanjem gena u stanicama ili organizmima, nasljeđivanjem gena, rasprostranjenosti, varijacijama i promjenama koje se događaju u populaciji, traži uzroke mnogih bolesti i anomalija.⁽¹⁾ Predmet proučavanja joj je organizam koji je spoj okoline i naslijeđa.

Glavni zadaci genetike su:

- Utvrditi kako se prenose osobine s roditelja na potomstvo
- Utvrditi čimbenike koji određuju nasljedne osobine
- Odrediti načine na koji se mijenjaju određene osobine ili stvaraju nove
- Primijeniti spoznaje u praksi⁽²⁾

1.1.1 GENI

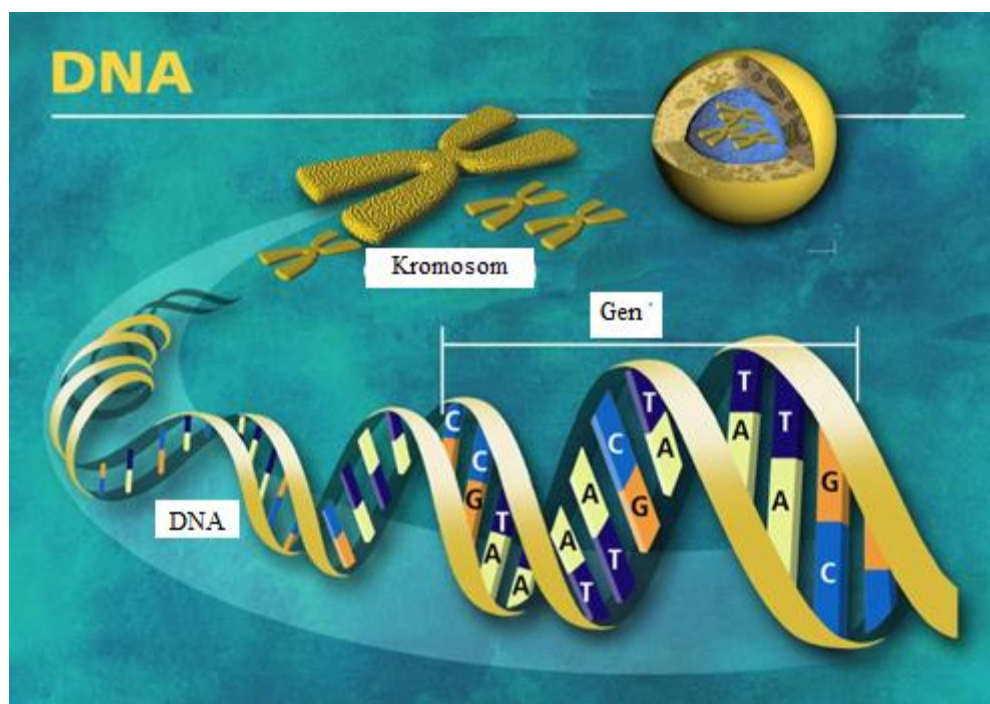
Gen je osnovna jedinica nasljeđivanja, preko koje se nasljedne osobine prenose sa roditelja na potomstvo; uputa je za izgradnju živog organizma. Gen je slijed određenog broja nukleotidnih parova u molekuli deoksiribonukleinske kiseline (DNA) ili ribonukleinske kiseline (RNA), koji kodira informaciju za protein, procesima transkripcije ili prepisivanja, u glasničku RNA (messenger RNA ili mRNA) i translacijom ili prevođenjem, u protein.

Jezgra svake žive stanice sadrži gene tipične za tu vrstu, a koji se nalaze u linearnom slijedu u kromosomima jezgre.⁽³⁾ Geni su raspoređeni linearno uzduž lanaca sekvence DNA, zvanih kromosomi.

Prva spoznaja o postojanju gena proizišla je od G. Mendela, koji je prilikom prikazivanja rezultata svojih eksperimenata križanja došao do spoznaje da postoje “stanični elementi” ili “faktori” koje nasljeđuje svaki organizam od svojih roditelja i koji određuju njegova svojstva i osobine. Walter Stanborough Sutton (1903) povezuje Mendelove “faktore nasljeđivanja” i kromosome. Wilhelm Ludvig Johannsen je 1909. uveo naziv *gen*, a Th. H. Morgan u svojim pokusima je dokazao da je svaki pojedini gen smješten na određenome mjestu, tzv. genomskom lokusu u kromosomu, i da svaki kromosom nosi više gena koji se nazivaju *vezani geni*.⁽³⁾

1.1.2 KROMOSOMI

Kromosomi su nositelji nasljednih čimbenika, odnosno gena. To su nitaste tvorevine u staničnoj jezgri biljaka i životinja (eukariota) te u stanicama bakterija i virusa (prokariota). Svaki je kromosom izgrađen od molekule DNA i mnoštva bjelančevina zvanih histoni.⁽⁴⁾ Kromosomi se oblikuju na način da se molekula DNA namata oko 8 okruglih bjelančevina, histona. Tada DNA postaje kraća i šira, te se uklapa u staničnu jezgru.



Slika 1. Struktura gena i kromosoma⁽⁵⁾

1.1.3 STRUKTURA NUKLEINSKIH KISELINA

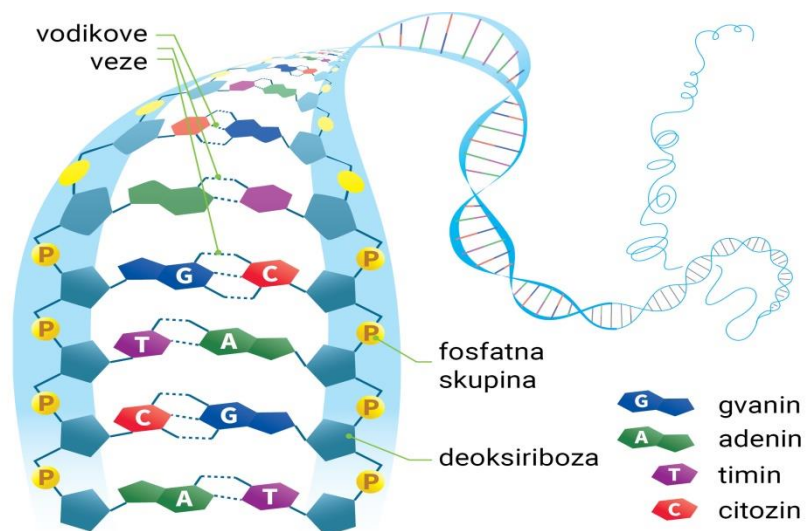
U svim stanicama živoga svijeta postoje dva tipa nukleinskih kiselina: ribonukleinska kiselina (RNK ili RNA) i deoksiribonukleinska kiselina (DNK ili DNA). Nukleinske kiseline (lat. *nucleus*: jezgra) su polimeri polinukleotidi (polimeri nukleotida). Nukleotid je spoj građen od:

- Šećera pentoze: riboze za ribonukleotid ili deoksiriboze za deoksiribonukleotid
- Fosforne kiseline
- Dušične baze: pirimidinske (citozin, timin, uracil) ili purinske (adenin, gvanin)⁽⁶⁾

Objekti nukleinske kiseline sadrže purinske dušične baze adenin (A) i gvanin (G) te pirimidinsku bazu citozin (C). U molekuli DNA druga pirimidinska baza je timin (T), dok je u molekuli RNA uracil (U). Dušične baze C-G povezane su s tri vodikove veze, a A-T (ili A-U kod RNA) s dvije vodikove veze.

DNA je osnovna građa gena, a sastoji se od 2 nukleotidna lanca koja se nalaze u obliku spiralne zavojnice, povezane međusobno komplementarnim nukleotidima na suprotnim stranama unutar dvaju lanaca. U eukariotskim organizmima DNA je smještena u jezgri.

Slijed nukleotida u genu u stanici se prevodi, translacija, kako bi se stvorio lanac aminokiselina, od čega nastaju polipeptidi. Slijed aminokiselina u proteinu odgovara slijedu nukleotida u genu. Ovaj odnos između slijeda nukleotida i slijeda aminokiselina naziva se genskim kodom. Proteini su bitni jer provode skoro sve funkcije koje su stanici potrebne za život.⁽²⁾



Slika 2. Molekula DNA⁽⁷⁾

1.1.4 POVIJEST GENETIKE

Iako je genetika kao znanost nastala tek teoretskim i eksperimentalnim radom Gregora Mendela sredinom 19.stoljeća, i prije njegova rada postojale se teorije o nasljeđivanju. Jedna od njih, za vrijeme Mendelova života, bila je teorija o izmiješanoj nasljednosti, odnosno da potomci nasljeđuju srednju vrijednost osobina svojih roditelja. Tu je teoriju pobio Mendel dokazujući da osobine nastaju kombinacijom više gena. U to vrijeme također je bila popularna ideja Jean-Baptiste Lamarcka o nasljeđivanju stečenih osobina, točnije da potomci nasljeđuju iskustva svojih roditelja, što se također pokazalo kao neispravno. Druga teorija bila je pangeneza, poprilično složena teorija, Charlesa Darwina koja je uključivala i stečene i nasljeđene osobine.⁽²⁾

1.1.5 VAŽNA OTKRIĆA U GENETICI

1865. godine G. Mendel postavlja temeljne zakone o nasljeđivanju predstavljene u "Versuche über Pflanzenhybriden" ("Eksperimenti hibridizacije biljaka"). Thomas Hunt Morgan je 1910. godine proučavanjem vinske mušice dao teoriju da se geni nalaze u kromosomima.⁽⁸⁾

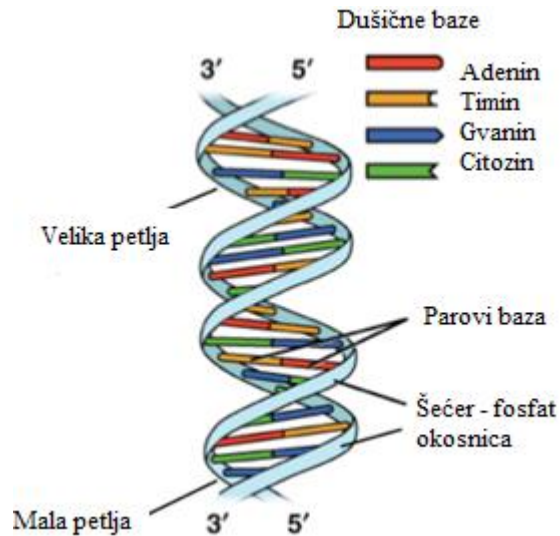
1869. Johannes Friedrich Miescher otkrio je deoksiribonukleinsku kiselinu. Iz jezgri ljudskih leukocita izolirao je tvar koja je bila bogata fosforom i dušikom, te ju nazvao “nuklein”.⁽⁹⁾

1944. godine Oswald Theodore Avery i suradnici otkrili su da je upravo molekula DNA nositelj genetičke upute (tj. da je DNA nasljedni materijal).



Slika 3. Biokovsko zvonce (Autor: Ivana Carev)

James D. Watson i Francis Crick su 1953. godine otkrili strukturu DNA. U svom modelu DNA su predstavili kao molekulu sadržanu od dva lanca koja su međusobno uvijena. Došli su do saznanja da se nasuprot baze A uvijek nalazi baza T, a nasuprot baze C baza G. Iz toga se može vidjeti da raspored baza na jednom lancu određuje raspored baza na drugom, komplementarnom lancu, odnosno ukazuje se na jednostavnu metodu dupliranja: ako se vrpce podijele, na osnovu sekvence stare vrpce, može se rekonstruirati nova vrpca.⁽⁶⁾



Slika 4. Dvostruka uvojnica DNA⁽¹⁰⁾

Iako je građa DNA otkrila kako djeluje nasljeđivanje, ostalo je nejasno kako DNA utječe na ponašanje stanica. U narednim godinama znanstvenici su nastojali otkriti kako DNA kontrolira proces stvaranja proteina. Otkrili su da stanica koristi DNA kao kalup za stvaranje glasničke RNA (mRNA-messenger RNA), čiji se slijed nukleotida koristi za stvaranje slijeda aminokiselina u proteinu.

Važan napredak dogodio se 1977. godine kada je Frederick Sanger razvio tehnologiju sekvenciranja DNA koja znanstvenicima omogućava čitati slijed nukleotida u DNA molekuli. Kary Banks Mullis osmislio je tehniku lančane reakcije polimerazom (PCR) kojom je omogućen brz način za izoliranje i umnožavanje određenog dijela DNA.⁽²⁾ Najvećim napretkom smatra se sekvenciranje ljudskog genoma 2003. godine.

1.2 JEDINSTVO I RAZNOLIKOST

Glavna karakteristika svih organizama je njihova individualnost, odnosno činjenica da dvije jedinke nisu iste. Svi organizmi imaju biološku predodređenost za fizički oblik i način ponašanja, dok u isto vrijeme znamo da postoji neograničena raznolikost individualnih izgleda, osobina i pojava u ponašanju. Ove dvije pojave su rezultat evolucije. Prva daje kontinuitet s vremenom, odnosno organizam se razvija prema već određenom nacrtu koji je

kodiran u genima, dok druga pojava daje osnovu za evolucijske promjene. Utjecaj genetskih osobina, koje se u genima prenose s roditelja na potomke, te utjecaj okoline čine individualnost svakog organizma.⁽¹¹⁾



Slika 5. Plavi encijan (Autor: Ivana Carev)

1.2.1 GENOTIP I FENOTIP

Genom je svukupna DNA nekog organizma. Obuhvaća kako gene, tako i sve ostale nekodirajuće nizove nukleotida.⁽¹²⁾

Genotip predstavlja sumu svih gena u genskim lokusima koji određuju nasljedna svojstva nekog organizma.⁽¹³⁾ Iako geni sadrže informacije koje organizam upotrebljava za svoje normalno funkcioniranje, važnu ulogu ima i okolina, odnosno fenotip organizma. Fenotip je najjednostavnije definirati kao interakciju gena i okoline.⁽¹⁴⁾ On predstavlja ukupan izražaj organizma, tj. zbroj njegovih morfoloških i fizioloških svojstava. Bitno je svojstvo fenotipa da se na njemu ne mora uvijek izraziti čitav genotip. Neki geni mogu doći do

izražaja tek u budućim generacijama.⁽¹⁵⁾ Svako je svojstvo organizma ponajprije izraz genetski uvjetovanih procesa i djelovanja u njegovom razvoju. Fenotip ne izražava konstantno svojstvo organizma, nego on tijekom života i razvoja jedinke, podliježe različitim promjenama koje su izazvane unutarnjim i vanjskim utjecajima (npr. djelovanju okoline i starenju). Prema tome, organizam u svom konačnom obliku i stanju rezultat je djelovanja naslijeđa i okoline u kojoj se nalazi. ^(14,15)



Slika 6. Kaćun (Autor: Ivana Carev)

2. PREGLED METODA U STANIČNOJ GENETICI

U staničnoj genetici, citogenetici, postoji velik broj metoda koje se mogu koristiti, a neke od njih su: metoda protočne citometrije, fluorescentna *in situ* metoda (FISH), genomska *in situ* metoda (GISH), višebojna fluorescentna *in situ* hibridizacija (mFISH), primed *in situ* DNA obilježavanje (PRINS)

Genomska *in situ* hibridizacija (engl.genomic *in situ* hybridization, GISH) je metoda koja omogućuje razlikovanje genoma u stanici. Koristi za razlikovanje genoma jednog roditelja od drugog obilježavanjem kromosoma jednog roditelja. ⁽¹⁶⁾ Genomska *in situ* hibridizacija predstavlja modifikaciju fluorescentne *in situ* hibridizacije i široko je korištena u proučavanju biljaka. Postala je jedna od najvažnijih tehnika za molekularnu citogenetiku. U metodi FISH kao sonde se koriste specifične sekvence DNA, dok GISH metoda kao sondu koristi ukupnu genomsku DNA neke vrste.⁽¹⁷⁾

Višebojna fluorescentna *in situ* hibridizacija (eng.multicolor fluorescence *in situ* hybridization, mFISH) koristi se za preciznu procjenu složenih kromosomskih garnitura. Metoda m-FISH nadopunjuje standardne citogenetičke metode, što je korisno u dešifriranju složenih kromosomskih preslagivanja.

Primjena ove tehnike na ljudskim kromosomima započela je 1996. godine uporabom 24 sonde za slikanje čitavih ljudskih kromosoma u multipleksu FISH (M-FISH) i spektralnoj kariotipizaciji.

Kompleti mFISH sonde za slikanje cijelog kromosoma uspješno se koriste za potvrđivanje i karakterizaciju translokacija, karakterizaciju kromosoma markera u kliničkoj genetici, citogenetiki tumora, mutagenezi i radiobiologiji.⁽¹⁸⁾

Tehnika *in situ* DNA obilježavanja (eng.primed *in situ* DNA labeling, PRINS) alternativa je FISH-u za otkrivanje nukleinskih kiselina.⁽¹⁶⁾ Metoda PRINS daje iste rezultate kao i FISH metoda. Razlika je u tome što se bojanje dobiva drugačije, jer je sonda u PRINS-u neobilježena, a bojanje je rezultat sinteze obilježene DNA na mjestima koja vežu sondu.⁽¹⁹⁾

Ova metoda koristi se u ljudskoj citogenetici za mapiranje sekvenci koje se ponavljaju sa malo kopija, za identifikaciju kromosoma, za otkrivanje aneuploidije u stanicama sperme.⁽¹⁶⁾

2.1 PROTOČNA CITOMETRIJA

Protočna citometrija je metoda za mjerenje optičkih karakteristika (fluorescencija, raspršenje svjetlosti) izoliranih čestica, bilo da se radi o stanicama, jezrama ili kromosomima, koje teku jedna za drugom u uskom tekućem toku kroz zraku svjetlosti.⁽²⁰⁾ Tijekom zadnja dva desetljeća i izumom novih fluorokroma, proširile su se primjene protočne citometrije, FCM-a, na različita područja bioloških znanosti, baveći se pitanjima fenotipske manifestacije, prostorne raspodjele i evolucijskog značenja umnožavanja genoma (poliploidija), kromosomske varijacije (aneuploidija) te varijacije u veličini genoma.⁽²¹⁾ Upotreba FCM-a seže u kliničku dijagnostiku, biotehnologiju te mnoga istraživanja poput imunologije, molekularne biologije, genetike, farmakologije, zoologije, botanike, biologije itd. Protočna citometrija omogućava određivanje različitih karakteristika na staničnoj (veličina, oblik, stanični ciklus) i unutar staničnoj osnovi (sadržaj DNA i RNA, pH vrijednost, udio proteina, veličina kromosoma itd.)⁽²⁰⁾

2.1.1 POVIJEST PROTOČNE CITOMETRIJE

Protočna citometrija razvijena je 1950-ih godina, ali njezina primjena u biljnoj znanosti oživjela je tek u kasnim 80-im, kada postaje važna metoda za određivanje količine DNA, razine ploidnosti i analizu staničnog ciklusa.⁽²²⁾

Već je 1973. njemački botaničar Friedrich Otto Heller koristio Impulszytphotometrie (njem. pulsnu citofotometriju), koji nije ni znao da je pokrenuo novo polje znanstvenog istraživanja, a koje će se tek naknadno nazvati protočna citometrija u biljkama.⁽²³⁾ U svom je radu Heller koristio hidrolitičke enzime da bi razgradio stanične stjenke i uspio osloboditi jezgre. Metoda je bila dugotrajna pa su je ostali rijetko slijedili.⁽²²⁾ Razvoj citometrije događa se 1983. kada David Galbraith i suradnici predstavljaju praktičnu i brzu metodu za stanično izoliranje jezgara iz tkiva biljaka. Od tada postaje glavna i najpouzdanija metoda pripreme uzoraka u biljnoj protočnoj citometriji. Može se analizirati bilo koja vrsta uzorka jer su njezine čestice (stanice, jezgre, kromosomi i druge) suspendirane i reda su veličine 0,2 do 50 µm. Tkivo se usitni u staklenoj petrijevoj posudi

koja sadrži pufer za lizu, koji omogućava razaranje staničnih i nuklearnih membrana i oslobađanje DNA, te fluorokrom.^(20, 23)

2.1.2 DIJELOVI CITOMETRA

Klasični protočni citometar sastoji se od pet dijelova:

- 1) izvor svjetlosti koji može biti: laser, živina ili ksenonska žarulja
- 2) protočna komora i fluidni sustav
- 3) optički sklop kojeg čine: leće, filteri i ogledala
- 4) dio za obradu signala

1. Izvor svjetlosti

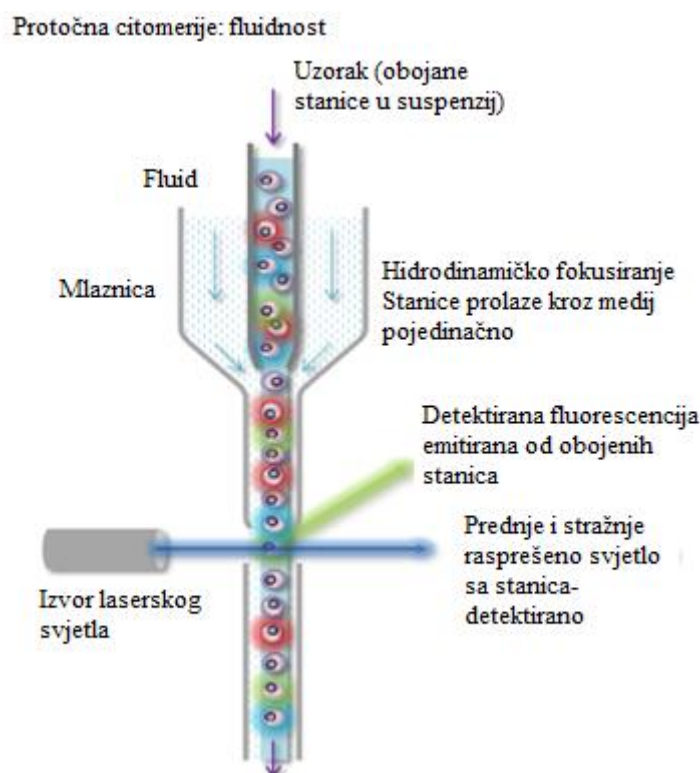
Kao izvor svjetlosti, u citometriji, moguće je koristiti lasere i/ili lučne žarulje. Laseri daju stabilan, uski snop jednoboje svjetlosti. Valna duljina ovisi o plinu kojim je ispunjena cijev. Najčešće se koristi argonski ionski laser koji je podešen na valnu duljinu od 488 nm (koji emitira tirkiznu boju). Od ostalih lasera u upotrebi su: helij-neonski laseri koji najviše svjetla emitiraju pri 633 nm; crveni diodni laseri (635 nm); zeleni čvrsti laseri (532 nm) ili helij-kadmijevi laseri s ultraljubičastim pobuđivanjem pri 325 nm. Glavni nedostatak lasera je njihova visoka otkupna cijena.

Živine, ili rijetko korištene ksenonske, lučne lampe koriste se, u protočnim citometrima, kao jeftin izvor svjetlosti. Glavnu prednost ovih lampi, u odnosu na lasere, daju im niži troškovi i jednostavno održavanje.⁽²⁰⁾

2. Komora za protok

Komora za protok predstavlja središnji dio instrumenta. Zadaća komore je prilagoditi čestice koje se kreću u uskom središnjem toku i poslati ih, jednu za drugom, u središte izvora svjetlosti, što se postiže tzv. hidrodinamičkim fokusiranjem. Ubrizgavanje uzorka vrši se pomoću tekućine. Uglavnom se koriste voda ili fiziološka otopina koje se kreću

većom brzinom i uzorak drže u sredini, nakon čega mlaz prolazi kroz otvor za sužavanje. Čestice se kreću pojedinačno i dolaze do točke pobuđivanja, s točnošću od oko 1 μm . Brzina stujanja je 1-10 m/s, pa je u sekundi moguće analizirati nekoliko desetaka ili stotina čestica.⁽¹⁶⁾ Kao potpora hidrodinamičkom fokusiranju koristi se tehnologija akustičnog fokusiranja. Akustični valovi fokusiraju uzorak prije njegovog uvođenja u tekućinu. Ovaj postupak može pomoći kako bi se dobili točniji podaci prilikom unosa uzoraka velikim brzinama.⁽²⁴⁾



Slika 7. Protočni citometar⁽²⁵⁾

3. Optička montaža

Optički dio instrumenta omogućuje fokusiranje zrake pobude, odabir potrebne valne duljine, prikupljanje izlazne svjetlosti i njegovu isporuku u detektore.⁽²⁰⁾

4. Dio za obradu signala

Svjetlosni snop fokusiran je na fotodetektore koji svjetlosni signal pretvaraju u impuls električne struje. Nakon prepojačanja i daljnje obrade signal se pretvara u veliko pojačanje. U komercionalnim protočnim citometrima dostupna su i linearna (koja se koriste za procjenu sadržaja nuklearne DNA) i logaritamska pojačala. Digitalni se podaci pohranjuju, vizualiziraju i idu na analizu u ugrađenom računalu. Nakon pohrane, dobiveni se podaci mogu podvrgnuti različitim statističkim postupcima kako bi se dobili željeni podaci.^(20,24)

2.1.3 OPTIKA I ELEKTRONIKA

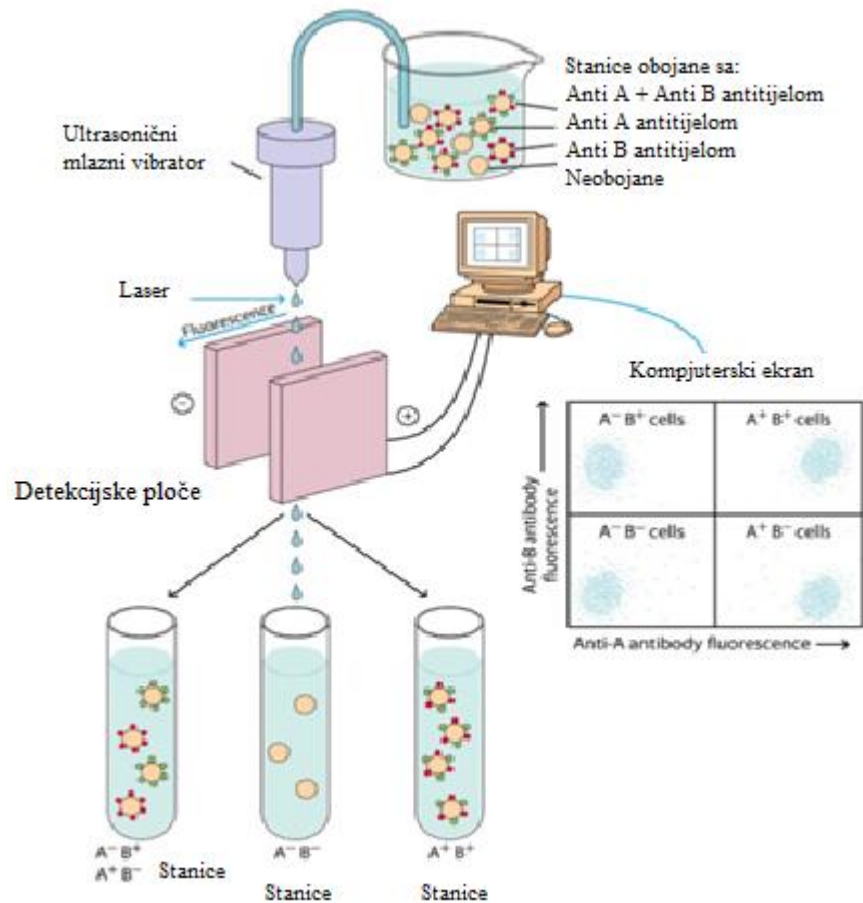
Svaki fluorokrom ima širok spektar fluorescencije, pa kombiniranjem više fluorokroma može doći do njihovog preklapanja, što dovodi do neželjenih rezultata tijekom analize. Ova pojava naziva se preklapanje spektara. Kako bi se izbjeglo preklapanje koriste se optički filtri i dikroična zrcala za filtriranje i premještanje svjetlosti na detektore. Za širenje emitirane svjetlosti po detektorima, spektralna protočna citometrija koristi prizme ili difrakcijske rešetke, što omogućuje mjerenje punog spektra svake čestice. Spektri koji su izmjereni iz pojedinačnih stanica miješaju se naknadno pomoću referentnih spektara svih korištenih bojila, što daje širi dizajn panela.⁽²⁴⁾

2.1.4 PRINCIP RADA

Protočna citometrija- metoda koja se upotrebljava za izolaciju specifičnih stanica iz smjese stanica na osnovu različitog raspršenja svjetlosti, odnosno fluorescencije, koja razdvaja različite stanice koje su obilježene fluorescentnim reagensima.

Princip rada je sljedeći: koncentrirana suspenzija stanica miješa se s puferom koji se upotrebljava za ubrizgavanje i stanice prolaze kroz snop laserskih zraka. Mjeri se emitirana fluorescencija i raspršenje svjetlosti svake stanice. Nakon toga suspenzija dolazi do otvora i stvaraju se male kapljice koje zapravo sadrže po jednu stanicu. Kako se stvaraju kapljice, nastaje negativan (-) naboj koji je proporcionalan količini fluorescencije te stanice. Stanice pozitivnog (+) naboja ili one nenabijene odvajaju se u električnom polju, dok se kapljice

identičnog naboja skupljaju. Ovaj način razdvajanja stanica relativno je brz- do milijun stanica u jednom satu.⁽²⁶⁾

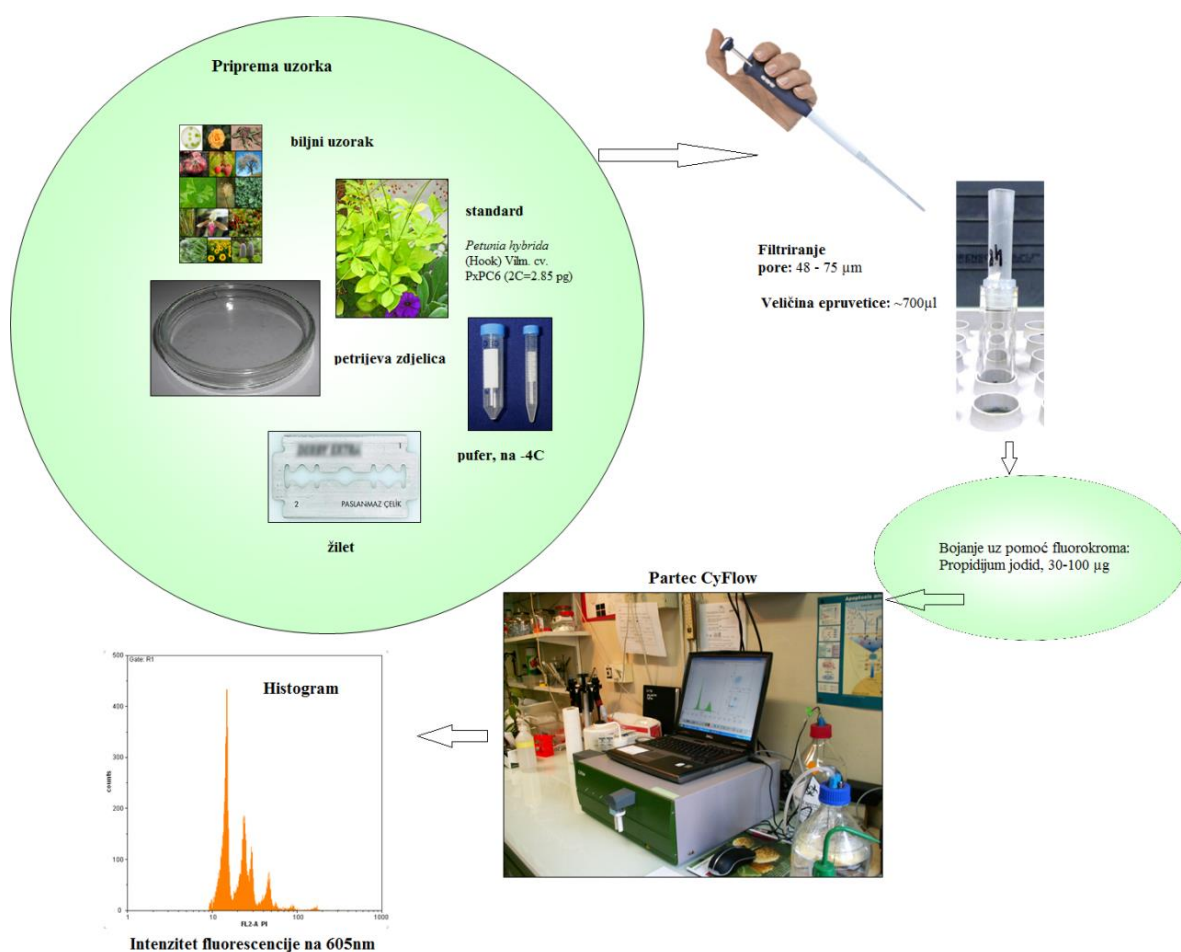


Slika 8. Prikaz rada protočnog citometra⁽²⁷⁾

2.1.5 PRIPREMA MATERIJALA ZA ANALIZU U PROTOČNOJ CITOMETRIJI

Za analizu protočnom citometrijom potrebne su suspenzije netaknutih jezgara koje se, prije analize, oboje određenim fluorokromom. Kako bi se sačuvao nuklearni sadržaj i sama DNA od razgradnje, te oslobodile jezgre iz netaknutih stanica koriste se različiti pufferi. Analiza sadržaja DNA pomoću ove metode temelji se na intenzitetu fluorescencije jezgara koje su obojene fluorokromom.⁽²²⁾

Uzorci biljnog tkiva koje je potrebno analizirati prvo se usitne pomoću noža u pufer otopini koja služi za ekstrakciju i izolaciju jezgara. Nakon toga se suspenzija filtrira na način da se uklone sve supstance u materijalu koje su veće od jezgre, a u otopini se ostave samo određeni dijelovi kako bi se dobio pouzdaniji DNA. Za uklanjanje topljivih tvari kao što su mitohondriji, kloroplasti, fenolni spojevi i enzimi koristi se ispiranje jezgara centrifugiranjem i resuspenzijom ili upotrebom pufera. Nakon filtriranja, uzorci se oboje specifičnim fluorokromom i podvrgavaju se analizi u protočnom citometru.⁽²³⁾



Slika 9. Prikaz određivanja veličine genoma kod biljaka korištenjem protočne citometrije⁽²⁸⁾

2.1.6 FLUOROKROM

Fluorokrom je kemijski spoj koji apsorbira svjetlost i emitira fluorescenciju različitih boja, odnosno različitih valnih duljina. Intenzitet fluorescencije, koji je slab u slobodnom obliku, povećava se nakon vezanja za nuklearne kiseline.

S obzirom na način vezanja razlikujemo tri vrste fluorescentnih mrlja:

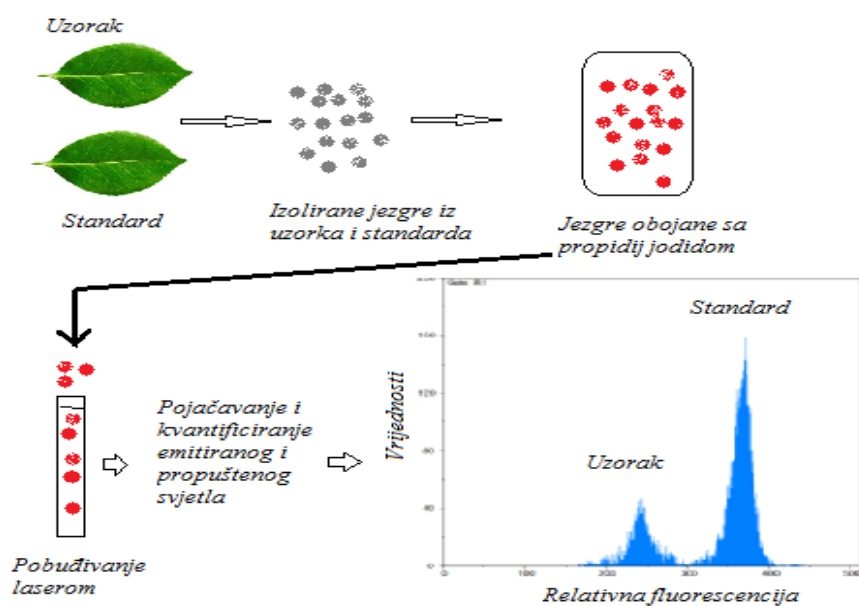
1. Bojila koja se kvantitativno interkaliraju u dvolančane nuklearne kiseline
2. Boje koje se selektivno vežu na mjesta bogata adenin-timinom
3. Boje koje se selektivno vežu na mjesta bogata guanin-citozinom

| FLUORESCENTNA MRLJA | NAČIN VEZANJA | VALNE DULJINE | |
|-----------------------|-------------------|----------------------|------------|
| | | POBUĐENOST | EMISIJA |
| Propidijev jodid (PI) | Umetanje | Plavo-zeleno 525 | Crveno 605 |
| Etidijev bromid (EB) | Umetanje | Plavo-zeleno 535 | Crveno 602 |
| SYBR Green | Umetanje | Plavo 488 | Zeleno 522 |
| DAPI | Specifično za A-T | UV 345 | Plavo 460 |
| Hoechst 33258 | Specifično za A-T | UV 360 | Plavo 460 |
| Mitramicin | Specifično za G-C | Ljubičasto-plavo 445 | Zeleno 575 |
| Kromomicin A3 | Specifično za G-C | Ljubičasto-plavo 445 | Zeleno 520 |

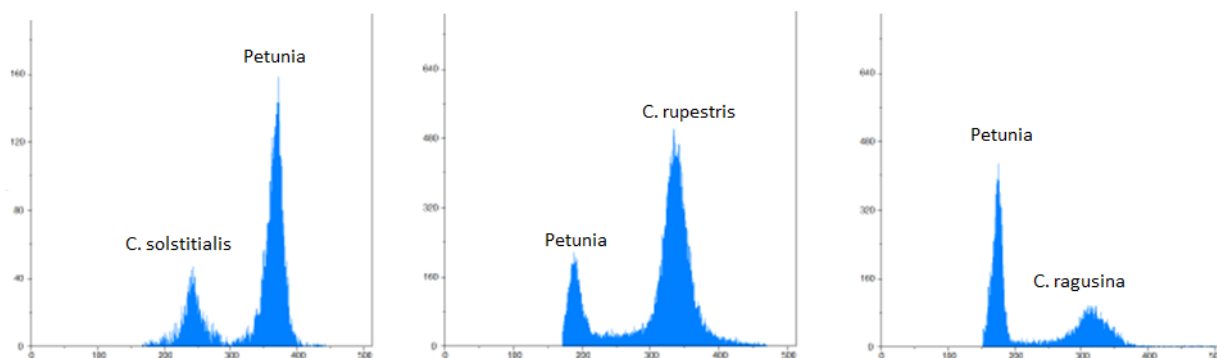
Tablica: prikaz fluorokroma⁽²³⁾

- Boje za umetanje (propidijev jodid, etidijev bromid i SYBR green): koncentracija ovih boja trebala bi biti iznad razine zasićenja (50-70 µg/ml), dok bi pH pufera trebao biti u rasponu vrijednosti 7,2-7,4. Etidijev bromid, za razliku od propidijevog jodida, ima manju razlučivost i nešto veću toksičnost, pa se preporučuje upotreba propidijevog jodida. Oni spadaju u interkalirajuće fluorokrome, tj. bez preferiranja baznih parova i najpogodniji su za procjenu sadržaja DNA.⁽²³⁾

- Propidijev jodid je popularni fluorokrom koji se koristi za određivanje količine DNA. Pobuđuje se plavo-zelenom svjetlošću, a emitira crvenu svjetlost.
- Fluorokromi s A-T specifičnošću: kao što je vidljivo iz tablice, svi imaju slična svojstva- pobuđuje ih UV zračenje, a emitiraju plavu fluorescenciju. Uspoređujući DAPI i Hoechst, bolju razlučivost i veći intenzitet fluorescencije ima DAPI.
- U fluorokrome s G-C specifičnošću spadaju mitramicin, kromomicin A3 i olivomicin. Koncentracije bi trebale iznositi oko 50-100 $\mu\text{g/ml}$. Kako bi se formirao kompleks s DNA, u mediju trebaju biti prisutni magnezijevi ioni. Budući da fluorokromi s G-C specifičnošću daju histograme niže razlučivosti, u citometriji se onda više upotrebljavaju fluorokromi s A-T specifičnošću.⁽²⁰⁾



Slika 10. Korištenje protočne citometrije u određivanju veličine jezgrinog staničnog genoma⁽²⁸⁾



Slika 11. Histogramski prikaz veličine genoma kod proučavanih vrsta roda *Centaurea*⁽²⁸⁾

2.2 FISH METODA- FLUORESCENTNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) metoda je tehnika u citogenetici koja pomoću nukleinske sonde/probe uočava određenu sekvencu u kromosomu. Koristi se za identifikaciju gena, dijelova gena, cijelih kromosoma, za otkrivanje promjena u kromosomima i za utvrđivanje raspodjele specifičnih DNA sekvenci.⁽²⁹⁾

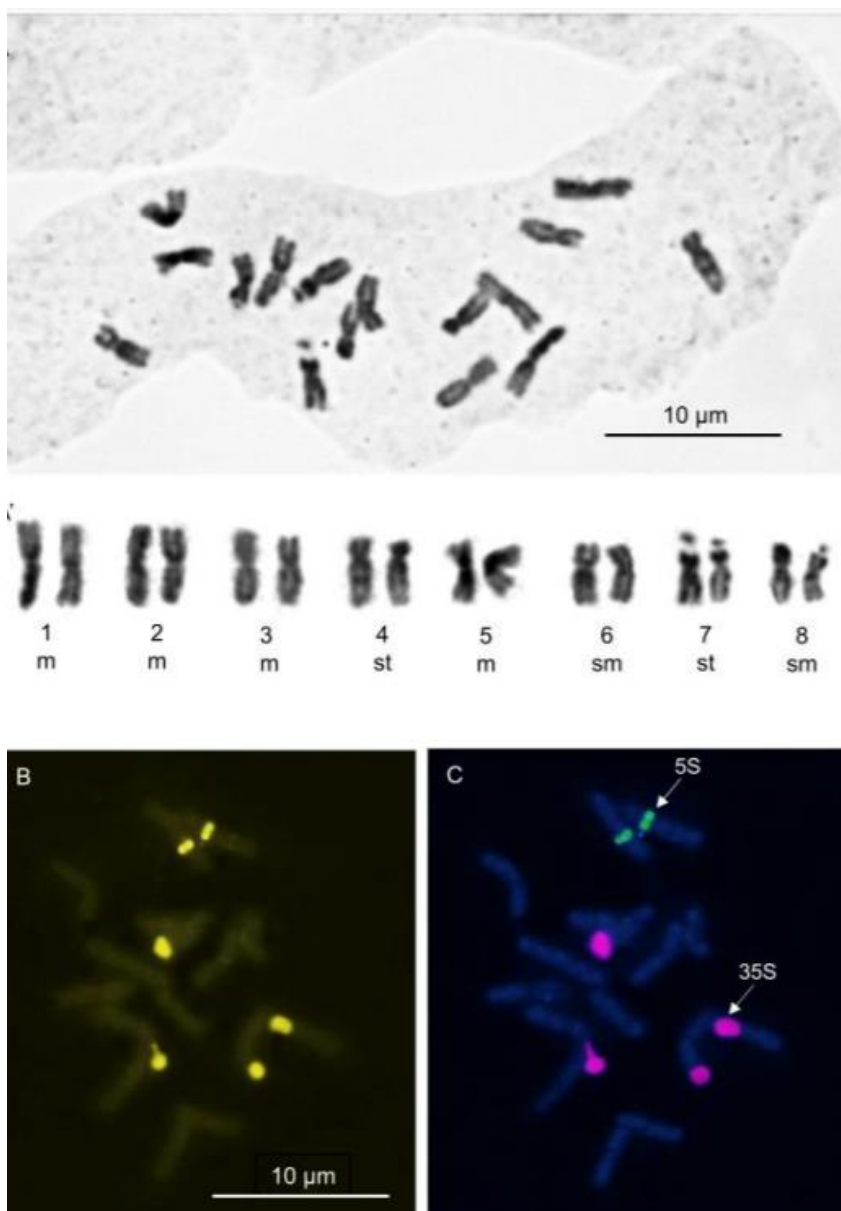
Metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije temelji se na osnovnom principu molekularne genetike, odnosno na hibridizaciji dvije komplementarne sekvence.

Sonda je fluorescentno označena molekula DNA koja je komplementarna sekvenci genoma kojeg je potrebno detektirati. Fluorescentno obilježene sonde hibridiziraju s molekulom DNA, koja je, kao i sonda, prethodno denaturirana, a rezultati se analiziraju fluorescentnim mikroskopom.⁽³⁰⁾

U samom početku razvoja citogenetike, znanstvenicima je bilo teško razlikovati pojedine kromosome, ali su se tijekom niza godina poboljšavali uvjeti za očuvanje i bojanje kromosoma. U novije vrijeme, kromosomi su tretirani mrljama koje stvaraju specifične načine vezanja, a parovi kromosoma raspoređuju se kao kariotip. Kariotip predstavlja kompletnu kromosomsku garnituru pojedine vrste. Zadnjih nekoliko desetljeća, metode koje su temeljene na fluorescentnoj *in situ* hibridizaciji, transformirale su citogenetiku u molekularnu znanost.⁽³¹⁾

Metoda FISH razvijena je 1981.godine obilježavanjem DNA fragmenata fluorokromima, koji su otkriveni ultraljubičastom svjetlošću.⁽²⁹⁾

Glavni preokret koji sa sobom donosi FISH je mogućnost citogenetske analize u bilo kojoj fazi staničnog ciklusa. Moguća je analiza i u interfaznim jezgrama, a ne samo u metafaznim kromosomima.⁽³²⁾

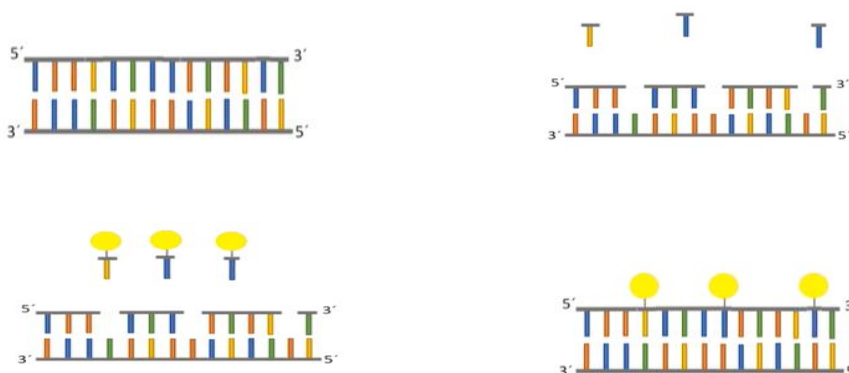


Slika 12. Fluorescentna hibridizacija *in situ* kromosoma vrste *Centaurea*⁽³³⁾

2.2.1 PRINCIP RADA FISH METODE

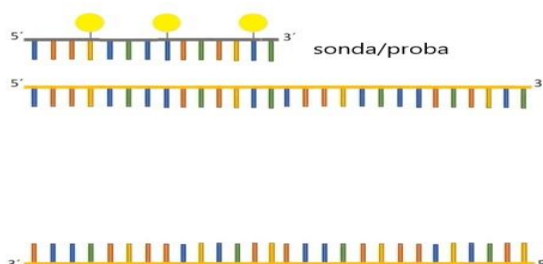
Metoda FISH ima nekoliko koraka. U prvom koraku vrši se fiksacija stanica. Fiksacija stanica uglavnom se provodi pomoću formaldehida. Formaldehid je oksidirajuće sredstvo i on uzrokuje jake protein-protein veze, te protein-nukleinska kiselina veze. Tako se omogućava stvaranje disulfidnih veza i drugih kovalentnih veza između makromolekula u stanici tijekom fiksacije.⁽³⁴⁾

U drugom koraku vrši se kreiranje probe/sonde. Kod kreiranja sonde, glavno je da je ona komplementarna sekvenci genoma koji se treba detektirati. Enzim DNaza sudjeluje u cijepanju dvolančane sekvence na jednom lancu. Potrebno je označiti sonde stavljanjem određene fluorescentne boje.⁽³⁵⁾



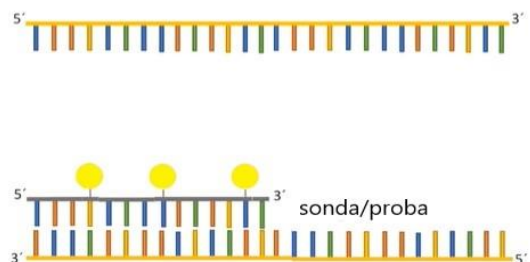
Slika 13. Kreiranje probe⁽³⁶⁾

U trećem koraku vrši se postupak denaturacije. U ovom koraku potrebno je denaturirati i sondu i molekulu DNA. Denaturacija se može postići grijanjem uzorka DNA na 95 °C (5-10 minuta), dok se sonda DNA zagrijava 5 minuta.⁽³⁵⁾



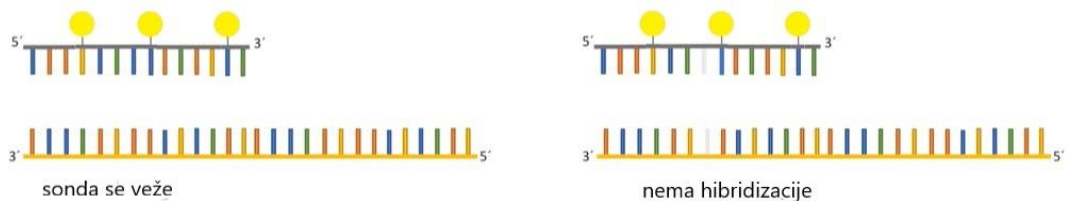
Slika 14. Denaturacija⁽³⁶⁾

U četvrtom koraku vrši se hibridizacija. Nakon denaturacije, temperatura se snižava i omogućeno je vezanje sonde na sekvencu DNA uzorka. Ostale sonde, koje nisu vezane za DNA uzorak, su isprane.⁽³⁴⁾

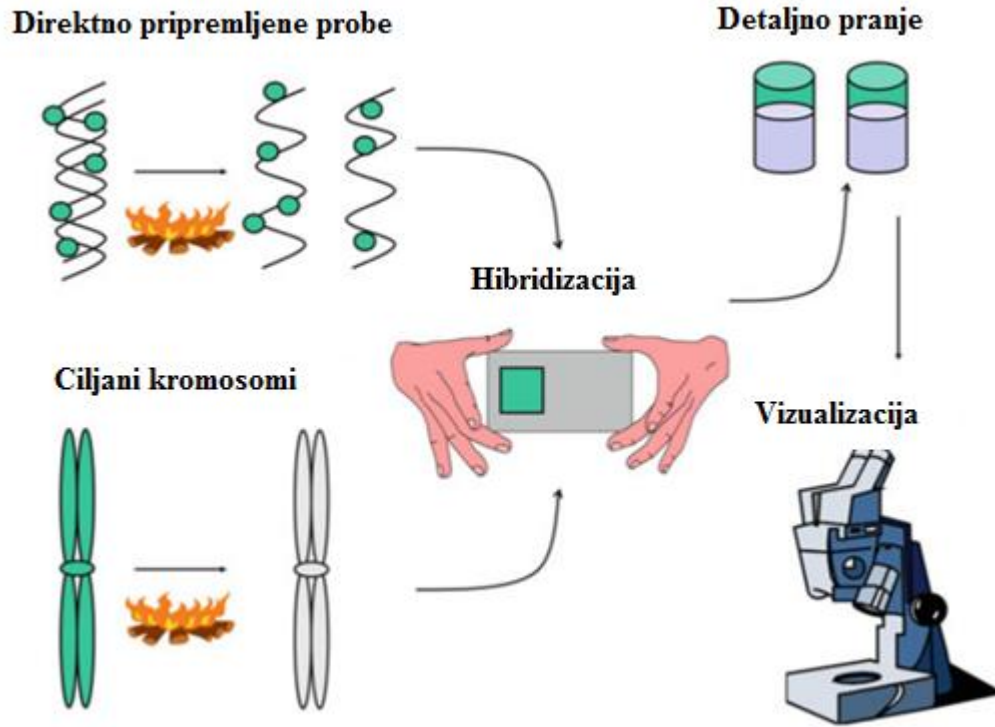


Slika 15. Hibridizacija⁽³⁶⁾

U petom koraku vrši se analiza uzorka pomoću fluorescentnog mikroskopa. Ako je sonda dizajnirana tako da se veže samo ako je 100% komplementarna genu, očekivano je da će se vidjeti 'mrlja' na kromosomu. S druge strane, ako se na genu dogodila bilo kakva mutacija, hibridizacija neće biti moguća i neće se pojaviti fluorescentni signal.⁽³⁴⁾



Slika 16. Komplementarnost⁽³⁶⁾



Slika 17. Shematski prikaz osnovnih koraka kod FISH metode⁽³⁷⁾

Kromosomski uzorak DNA i sonda su denaturirani djelovanjem topline. Sekvence sonde komplementarno se hibridiziraju na određene, ciljane sekvence. Ostatak sonde koji nije vezan podvrgava se ispiranju. Hibridizirana sonda i uzorak analiziraju se pomoću fluorescentnog mikroskopa.⁽³⁷⁾

2.2.2 VRSTE SONDA/PROBA U FISH METODI

Većina komercijalno dostupnih sondi pripređuje se odabirom klonova kvasnih kromosoma (YAC= Umjetni kromosom kvasca), bakterijskih (BAC= Bakterijski umjetni kromosom) ili P1 umjetnih kromosoma (PAC= Umjetni kromosom bakteriofaga P1)⁽³²⁾

Postoji nekoliko vrsta FISH sondi koje ovise o specifičnom dijelu kromosoma koji se obilježava. Tako postoje sonde za obilježavanje čitavih kromosoma (WCP= Whole chromosome paints), centromerne sonde (CEP= Centromeric Enumeration Probe), lokus specifične sonde (LSI= Locus-Specific Identifier).⁽³¹⁾

Pomoću FISH metode mogu se identificirati i analizirati različite sekvence DNA, a njihova identifikacija ovisi o sondi DNA koja se koristi. Sonde za obilježavanje čitavih kromosoma (WCP): predstavljaju skupinu manjih sondi, od kojih se svaka sonda veže za različit slijed duž kromosoma. Velika prednost korištenja ovih sondi je mogućnost označavanja različitim fluorescentnim bojama, tako da se svaki kromosom može označiti svojom jedinstvenom bojom.⁽³⁸⁾

WCP sonde koriste se za ispitivanje kromosomskih abnormalnosti, otkrivanje translokacija i duplikacija, za identifikaciju kromosoma u složenim strukturnim poremećajima.⁽²⁶⁾

Glavni nedostatak ove sonde je nepotpuna hibridizacija duž kromosoma, a posebno u području telomera i centromera. Stoga se može dogoditi da se ne detektiraju promjene koje obuhvaćaju upravo ova područja.⁽³⁹⁾

Centromerne sonde (CEP): sadrže ponavljajuće DNA sekvence koje se nalaze u sredini svakog kromosoma. Ove sonde koriste se kako bi se utvrdilo ima li jedinka točan broj kromosoma, te za preciznu identifikaciju strukturnih aberacija.^(38, 30)

Lokus-specifične sonde: vežu se za određeno područje na kromosomu. LSI sonde upotrebljavaju se kada se izdvoji mali dio gena i treba utvrditi na kojem kromosomu se nalazi gen ili pak koliko kopija gena postoji u nekom genomu.⁽³⁴⁾

3. RASPRAVA

Glavna prednost protočne citometrije je jednostavnost i brzina izvedbe (traje nekoliko minuta). Optimalna brzina kojom se mjere čestice je nekoliko desetaka čestica u sekundi, pa se mogu brzo istražiti brojni uzorci. Posebna pogodnost ove tehnike je ta da su za pripremu uzorka potrebne male količine biljnog tkiva (otprilike 0,5 cm²). Iako se, za izoliranje jezgra, koriste uglavnom mladi listovi, mogu se upotrijebiti i drugi dijelovi biljnih tkiva poput korijenja, stabljike, sjemena, latica itd.

Pored svih pozitivnih strana, kao i svaka metoda, tako i FCM ima nekih nedostataka. Glavni nedostatak ove metode je potreba za svježim biljnim materijalom. Budući da dostavljene uzorke treba, što je prije moguće, analizirati, transport materijala iz polja u laboratorij mora biti što brži. Srećom većina materijala može se, do nekoliko dana, zadržati u hladnjaku na temperaturi od 4 °C, a ovo vrijeme može se produljiti i do nekoliko tjedana za vrste koje imaju tvrd i kožnat list.

Fluorescentna *in situ* hibridizacija je metoda koja uz pomoć fluorescentno označene nukleinske sonde uočava željenu sekvencu u kromosomu. U ovisnosti kojom bojom je obilježena sonda, sekvenca u kromosomu se tako može vidjeti kao plavi, crveni ili zeleni signal, što omogućuje uočavanje kromosomskih promjena. Metoda FISH je moćna metoda koja se koristi za mapiranje gena, precizno lociranje položaja gena na kromosomima, identifikaciju gena i dijelova gena, identifikaciju kromosoma i otkrivanje promjena u kromosomima. Ova metoda ima veliku osjetljivost i specifičnost pri otkrivanju promjena u genomu, identifikaciji nepoznatog kromosoma ili njegovog dijela.

Pored svih prednosti, FISH metoda ima i nekoliko nedostataka, kao što je nemogućnost preciznije identifikacije segmenata kromosoma koji su zahvaćeni delecijom, duplikacijom ili inverzijom.

4. ZAKLJUČAK

U ovom završnom radu opisane su dvije metode koje se koriste u staničnoj genetici: metoda protočne citometrije i fluorescentna *in situ* metoda.

Napretkom tehnologije i stvaranjem novih fluorokroma, obje metode proširile su se na razna područja bioloških znanosti. Metode su pronašle svoju upotrebu u biotehnologiji, kliničkoj dijagnostici, imunologiji, farmakologiji, genetici, molekularnoj biologiji i drugim srodnim područjima.

Protočna citometrija postaje sve važnija metoda u suvremenoj kliničkoj medicini zahvaljujući činjenici da ona daje vrlo točnu, osjetljivu i brzu analizu velikog broja stanica i staničnih komponenti. Budući da mjeri više parametara, protočna citometrija predstavlja multiparametarsku metodu.

Metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije daje direktnu identifikaciju gena i njihovih dijelova, kromosomskih sekvenci i cijelih kromosoma. Ona omogućava citogenetsku analizu u bilo kojoj fazi staničnog ciklusa, pa je tako moguća analiza i u interfaznim jezgrama, a ne samo u metafaznim kromosomima.

5. LITERATURA:

1. A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, molecular biology of the cell, Fifth edition, UK, 2008
2. G. Khedkar, B. Prakash, C. Khedkar, B. Chopade, Nucleic Acids, (2015), 84-92, doi: [10.1016/B978-0-12-384947-2.00487-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00487-6)
3. B.D. Hames; N.M. Hooper, Biochemistry, New York, 2005
4. URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=34167> (22.2.)
5. Slika: https://www.google.com/search?q=molekula+dna&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjUpsDInPznAhVLhqQKHe9DAqIQ_AUoAXoECAwQAw&biw=1536&bih=722&dpr=1.25#imgrc=4Mb_oVghir7M-M (26.2.)
6. M.A. Ferguson-Smith, History and evolution of cytogenetics, (2015) 8:19 DOI 10.1186/s13039-015-0125-8
7. Slika: https://www.google.com/search?q=molekula+dna&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjUpsDInPznAhVLhqQKHe9DAqIQ_AUoAXoECAwQAw&biw=1536&bih=722&dpr=1.25#imgrc=n9RCmRncIE9R3M (26.2.)
8. URL: <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/b52a40b8-3bf7-4d5c-bb15-65a258050885/biologija-8/m01/j06/index.html> (22.2.)
9. URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=68153> (24.2.)
10. Slika: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-discovery-and-structure-of-dna/a/discovery-of-the-structure-of-dna> (26.2.)
11. M. Ingrouille, B. Eddie, Plants: Evolution and Diversity, Cambridge University Press, New York, 2006.
12. URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=21638> (25.2.)
13. URL: <http://www.bioteka.hr/modules/lexikon/entry.php?entryID=228> (25.2.)
14. URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=19243> (23.2.)
15. B. Vrtar, J. Balabanić, M. Meštrov, Genetika, evolucija, ekologija : udžbenik iz biologije za IV. razred gimnazije, Školska knjiga, Zagreb, 1998.
16. R.J. Singh, Plant cytogenetics, second edition, CRC Press LLC, USA, 2003.

17. G.S. Silva, M.M. Souza, Genomic *in situ* hybridization in plants, **12** (3): (2013) 2953-2965, doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2013.August.12.11>
18. T. Liehr, H. Starke, A. Weise, H. Lehrer and U. Claussen, Multicolor FISH probe sets and their applications, **19** (2004) 229-237
19. J. Koch, Primed *in situ* Labeling, **204** (2003), doi: 10.1385/1-59259-300-3:77
20. J. Suda, An employment of flow cytometry into plant biosystematics, Charles University in Prague, 2004
21. J. Suda, P. Pyšek, Flow cytometry in botanical research, **82** (2010) 1–2
22. J. Loureiro, E. Rodriguez, J. Doležel, C. Santos, Comparison of Four Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry, **98** (2006) 679–689, doi: 10.1093/aob/mcl141
23. M. Pasqual, L. Aparecida Salles Pio, A. Lima Oliveira, D. Rodrigues Soares, Flow Cytometry Applied in Tissue Culture, (2012) <http://dx.doi.org/10.5772/50986>
24. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry (8.9.)
25. Slika: https://cdn1.sinobiological.com/styles/default/images/pdyimg/FCM/flow_cytometry_fcm_facscp/what_is_flow_cytometry/u10.png (18.3.)
26. URL: <https://vonchy.wordpress.com/2013/02/05/protocna-citometrija/> (16.3.)
27. Slika: https://www.google.com/search?q=proto%C4%8Dna+citometrija&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiX0aOMq6boAhXB86YKHbNACJUQ_AUoAXoECAsQAw&biw=1536&bih=674#imgrc=z_kXXONgBHQ-sM (19.3.)
28. Slika: Carev I., Fitokemijski i citogenetski profil odabranih biljaka roda *Centaurea* (Asteraceae) (2016) Zagreb
29. A. Younis, F. Ramzan, Y. Hwang, K. Lim, FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants, (2015)
30. I. Petković, Molekularna citogenetika u dijagnostici mikrodelecijskih sindroma, **48** (2004) 143-149
31. U. Qaisar, A. Tayyeb, T.A. Bhat, Techniques of Chromosomal Studies, Springer India (2017) Doi:10.1007/978-81-322-3673-3_14
32. S.L. Mundle, R.J. Koska, Fluorescence In Situ Hybridization, A Major Milestone in Luminous Cytogenetics

33. Slika: I. Carev, M. Ruščić, M. Skočibušić, A. Maravić, S. Siljak-Yakovelv, O. Politeo, Phytochemical and cytogenetic characterization of *Centaurea solstitialis* L. (Asteraceae) from Croatia // *Chemistry & biodiversity*, **14** (2017), 2; e1600213-1 doi:10.1002/cbdv.201600213.
34. J.M. Bartlett, J.E. Roulston, *Molecular diagnosis of cancer, Methods and protocols*, second edition, New Jersey, 2004
35. H.W. Bass, J.A. Birchler, *Plant Cytogenetics, Genome structure and chromosome function*, Vol. 9, Springer Science+Business Media, New York, 2012
36. Slika: <https://www.youtube.com/watch?v=LiRJoTi44TA> (5.8.)
37. Slika D.J. Wolff, *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*, Springer Science+Business Media, New York (2013) Doi: 10.1007/978-1-4419-1688-4_17
38. URL: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Fluorescence-In-Situ-Hybridization> (3.8.)
39. J. Vraneković, Primjena tehnika molekularne citogenetike u detekciji kromosomskih promjena, *Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci*, **42(40)** (2004) 247-255