



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Derleme Makale

## *In situ* Hibridizasyon Yöntemleri

Kezban ÖZDEMİR<sup>a</sup>, Fulya Dilek GÖKALP MURANLI<sup>b</sup>, Martin Orlinov KANEV<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne, TÜRKİYE*

<sup>b</sup> *Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Trakya Üniversitesi, Edirne, TÜRKİYE*

\**Sorumlu yazarın e-posta adresi: martinkanev@trakya.edu.tr*

### ÖZET

Bu çalışmada, günümüzde sıklıkla kullanılan *In situ* hibridizasyon teknikleri, çeşitleri ve kullanım alanlarına yer verilmiştir. *In situ* melezleme belirli bir nükleik asit dizisinin doku veya hücre içerisinde bulunduğu yeri tespit etmeye yönelik bir tekniktir. *In situ* melezleme özel DNA veya RNA dizilerine bağlanabilen, işaretli ve tamamlayıcı DNA/RNA nükleik asit ipliklerinin kullanıldığı hibridizasyon yöntemidir. Tek iplikli nükleik asit moleküllerinin uygun koşullar altında tamamlayıcı dizileri ile eşleştirilerek hibrit moleküller oluşturulması temeline dayanır. Böylece, RNA veya DNA molekülleri üzerindeki özgün dizilerin belirlenmesi sağlanır. Histolojik dokularda hedef mRNA'nın işaretlenmiş nükleik asit probu ile hibridizasyonu sağlanarak dengeli hibritler oluşturulması ve böylece probun yerinin görülür kılınması sağlanır. Bu teknoloji ayrı türlerdeki hücre popülasyonlarında gen anlatımı çalışmalarında kullanılan kesin bir metottur. Günümüzde kanser araştırmalarında, toksikolojik çalışmalarda ve kromozom anomalilerinin tespitinde genetik tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *In situ* hibridizasyon, Prob, Genetik tanı yöntemi

## *In situ* Hybridization Techniques

### ABSTRACT

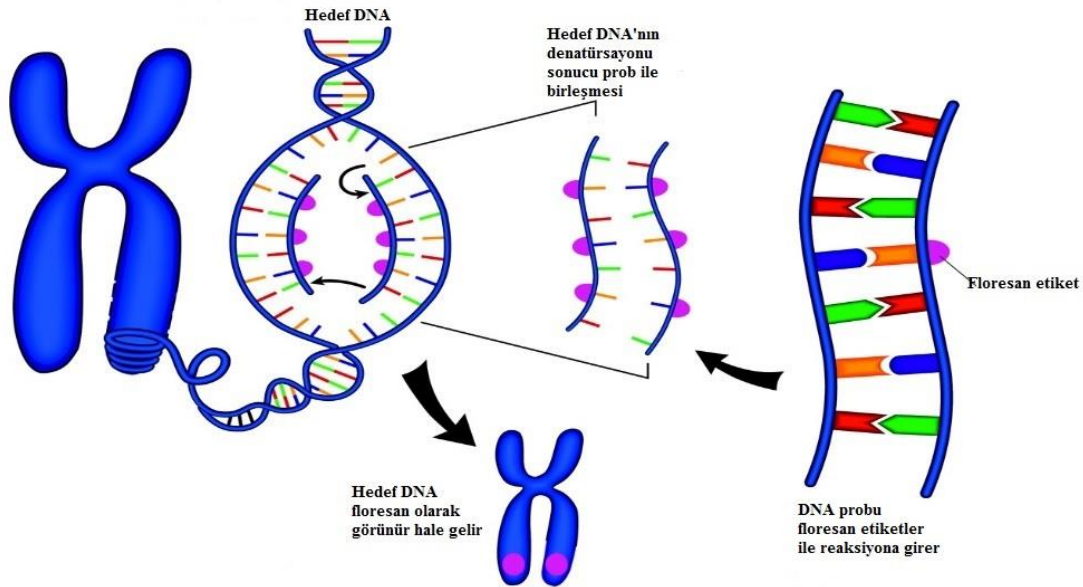
In this study, a review was presented about *in situ* hybridization techniques, types and areas of usage. *In situ* hybridization is a technique intended to detect locations of a particular nucleic acid sequence in cells or tissues. *In situ* hybridization is a method that labelled and antisense use of DNA/RNA nucleic acid strands, bind to specific DNA or RNA sequences. The technique based on to form hybrid molecules by coupling single-stranded nucleic acid molecules with complementary sequences under optimal conditions. This ensures the identification of specific sequences on DNA or RNA molecules. In histological tissues target mRNA is hybridized with labelled nucleic acid probe to ensure forming of stable hybrids and thus the location of the probe is allowed to be seen. This technology is precise method used for gene expression studies in cell populations in different species. Today, this method is used as a diagnostic tool in cancer researches, toxicological studies and determination of chromosome anomalies.

**Keywords:** *In situ* hybridization, Probe, Genetic diagnosis

## I. GİRİŞ

**G**EÇMİŞİ 30 yıldan öncesine dayanan bir yöntem olan *In situ* hibridizasyon (ISH), hücrel incelemelerde işlevsel protein kodlayan DNA dizilerinin kromozomlardaki yerini belirlemede işlevsel bir yöntemdir. Son 15 yıl içinde yardımcı floresan tekniklerin gelişmesiyle birlikte, bu tekniğin uygulanmasında bir artış gözlenmiştir. Nükleik asit dizilerinin sitolojik ve histolojik preparatlarda belirlenmesini sağlayan ve esasen çift iplikli DNA veya RNA zincir oluşumunu temsil eden bir yöntemdir [1, 2, 3].

İşlevsel bir proteinin oluşumunda o proteini üretecek genden sorumlu mRNA'nın sentezi gereklidir. Eğer incelenen preparatta ilgili mRNA bulunuyorsa, o sitolojik veya histolojik kesitlerde ilgili genin ifade edildiği anlaşılmaktadır. mRNA'nın tespit edilmesi hangi genin translasyona uğradığını bulmada kolaylık sağlar. Şekil 1'de de görüldüğü gibi hibridizasyon basamakları tamamlayıcı zincirdeki nükleotid sıraları bulunduran tek zincirli DNA veya RNA arasında oluşabilir [4].



Şekil 1. *In situ* hibridizasyonun prensibi

Tekniğin uygulanabilmesinde, belirlenmek istenilen nükleik asit sıralarına tamamlayıcı olan tek zincirli DNA veya RNA dizileri kullanılır. Kullanılacak DNA veya RNA dizileri radyoaktif veya radyoaktif olmayan bir etiket ile işaretlenmektedir. Bu etiketleme ile melezleme sonucu oluşan çift zincirli molekül tanımlanabilmektedir. Araştırılan nükleik asit dizisine tamamlayıcı olan ve belirteç görevi yapan tek zincirli özgün nükleik asit parçalarına prob adı verilir. *In situ* hibridizasyonda tekniğinde kullanılan problemlerin belirlenmesinde bazı önemli noktalar bulunmaktadır. Prob olan spesifik nükleik asidin cinsi ve uygun etiketleme çeşidi bu seçimde rol oynar [5,6].

### A. KULLANILAN PROBLAR

*In situ* hibridizasyonda kullanılan DNA problemleri, yüksek oranda özgül aktivasyon özelliğindedir ve kullanım öncesinde denatürasyon işlemi yapılmalıdır. RNA problemleri ise en yüksek stabiliteye sahiptir ve RNaz'larla kolaylıkla yok edilebilirler. 15-50 nükleotidden oluşan oligonükleotid problemleri hedef

diziye antisense tasarımları yapılır ve oldukça stabildirler. Nispeten ufak boyutlarından dolayı hedeflenen bölgeye kolaylıkla girebilirler [7, 8, 9].

## B. KULLANILAN ETİKETLER

En sık kullanılan etiket Digoxigenindir ve bağlanma antikolar yardımı ile olur. Biotin etiketi ise avidin ile beraber kullanılır. Floresan bir etiketleme olanağı sağlar. Kullanılan etiketlerde en hassa görüntülemeyi bazı memeli dokularında bulunan alkalın fosfataz sağlar [9].

## C. UYGULANAN İŞLEMLER

Hibridizasyon öncesi, probun hedef olan bölge dışındaki moleküllere bağlanmasını önlemek ve diğer yapısal elemanlar ile özgül olmayan etkileşimleri indirgemek amacıyla preparatlara bazı işlemler uygulanır. DNA dizilerini belirlemek için yapılan işlemlerde intrasellüler RNA moleküllerini prob ile hibridizasyonu önlenir ve endojen RNA'nın ortamdaki uzaklaştırılarak istenmeyen zemin boyanması azaltılmış olur. Asetilasyon işlemi RNA ile RNA *In situ* hibridizasyonu için uygun bir basamaktır ve böylece endojen biyotin ortamdaki uzaklaştırılmış olur [10, 11].

Dokunun geçirgenliğini arttırmak üzere proteazlar, hedef nükleik asitleri maskeleyen proteinleri sindirerek etiketlerin ve problemlerin dokuya rahat bir şekilde girebilmesini sağlar. Eğer uygulanan proteaz konsantrasyonu yeterli olmazsa standartta hibridizasyon oluşur ve bu durumda kullanılan proteaz konsantrasyonu artırılmalıdır. Preparatlardaki morfolojinin zarar görmesi durumunda konsantrasyon tekrar düşürülmelidir. Triton-X ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) en sık kullanılan deterjan ajanlarıdır. Prob olarak kullanılan enzim varlığında ise preparattaki endojen enzim denatüre edilmelidir [12].

Proteaz uygulamasını takiben preparatları tekrar fikse etmek gerekebilir. Hibridizasyon öncesi fiksasyon preparattaki nükleik asitlerin daha sonraki kullanımlar için kaybını önlemektedir. DNA ile DNA arasındaki *In situ* hibridizasyon için hedef DNA dizilerinin ve probun denatüre olması gerekir. Denatürasyon işlemi alkali, ısı ya da asit muamelesi yapılmaktadır. Denatürasyon işlemleri sonucunda çoğunlukla morfolojik kayıplar söz konusudur [13].

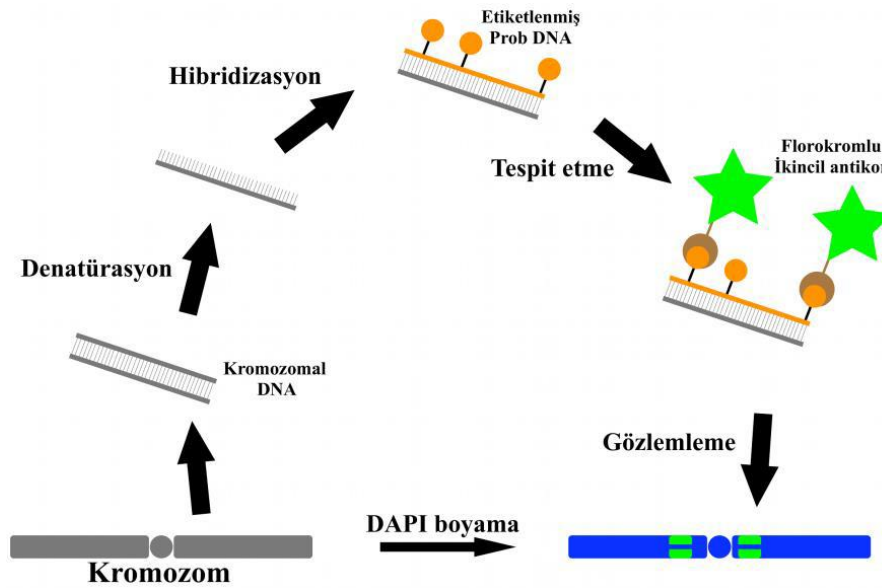
En önemli basamak olan melezlemede hedef nükleik asitler ve prob DNA ile DNA hibridleri için 37°C'de ve RNA ile RNA hibridleri için de 50-55°C'de 1 gece inkübe edilir. Bu sıcaklıklar, çift zincirli DNA'nın yarısının denatüre olması için gerekli sıcaklık değerinin (T<sub>m</sub>) 20-25°C altındadır. Prob uzunluğu ile konsantrasyon arasında doğru orantı bulunmaktadır. Etiketli nükleik asit problemleri, formamid, dekstran sülfat, bloke edici DNA veya tRNA, SDS, sığır serum albumini ve çeşitli tuzlar içeren bir hibridizasyon karışımına konur. Formamid denatürasyonu dokuda meydana gelecek bozulmaları önlemek için reaksiyonun uygun bir sıcaklıkta gerçekleşmesini sağlar. Dekstran sülfat, melezlenme oranını artırır. SDS, dokunun permeabilitesini artırır ve böylece prob dokuya daha hızlı girer. Sığır serum albümini ise probun doku harici spesifik olmayan bağlanmalarını azaltmaktadır. Hibridizasyon işlemi ortalama 3 ile 5 saatte tamamlanabilir ve bir gece inkübasyona bırakma işleminin kesinliğini artırır [14, 15].

Melezleme sonrası yıkamalar zayıf bağlanan probu temizlemek ve sadece doğru eşleşmiş olanları bırakmak amacıyla uygulanır. RNA ile RNA hibridizasyonu için son bir işlem daha uygulanması gereklidir. RNA problemleri yapışmaya eğilimlidir; bu nedenle yoğun zemin sinyali oluşturdukları için posthibridizasyon işlemi olarak RNaz uygulaması yapılabilir [16].

## II. FLORESAN *IN SITU* HİBRİDİZASYON

Klasik sitogenetik dönemden, modern moleküler sitogenetik döneme geçiş kalıtımın temel unsuru olan deoksiribonükleik asit (DNA) moleküllerinin teknolojik gelişmeyle orantılı olarak görüntülenebilmesiyle iki aşamada gerçekleşmiştir. İlk adım, hücre içerisindeki kromozomların doğal yapısını bozmadan diğer bir ifadeyle, *In situ* şartlarda hibridizasyon yapabilme kabiliyetinin geliştirilmesiyle başlamıştır. Bu amaçlar doğrultusunda yöntemlerdeki bazı modifikasyonlar ile çeşitli teknikler geliştirilmiştir [17].

Moleküler sitogenetikteki hızlı ilerlemeler, bantlama ve boyama tekniklerinin hızlı gelişimiyle sağlanmıştır. Standart bantlama teknikleri yalnızca bir denemede bir hücre için tüm genomu sorgulamada yetersiz kalmaktayken, floresan *In situ* hibridizasyon (FISH), genleri ve kromozomları boyamada floresan moleküllerin kullanıldığı bir yöntem olarak bantlama teknikleriyle birlikte iyi bir değerlendirme aracıdır. Floresan işaretleme, *In situ* hibridizasyon prensibine göre, prob ve örnek arasında melez bir yapı meydana gelmesiyle sinyale dönüşen bir işlemdir. FISH, Southern blot tekniğinin analogudur. FISH, floresan işaretlerle etiketlenen, tamamlayıcı DNA'ya, bu DNA dizilerinin yerleşimini görebilmek için hibridizasyona uğrayan veya bağlanan tek zincirli DNA (prob) kısa dizilerini gerektiren bir yöntemdir. Bu yöntem gen haritalanmasında ve kromozom aberasyonlarının tanımlanmasında kullanılır. Kromozomların çalışılmasında kullanılan birçok teknik, aktif olarak bölünen hücreleri gerektirirken (metafaz kromozomları), FISH aynı zamanda bölünmeyen hücrelere de uygulanabilir (interfaz nükleusu). Metafaz delesyonlarının belirlenmesinde ve interfaz evresinde genelde kromozomların yeniden düzenlenmesinin ve kromozom sayılarının belirlenmesinde kullanılır. FISH ile sitogenetik çalışmalara yardımcı olan ve iyi tanımlanmış uygulamalar geliştirilmiş olmasına rağmen, amaca uygun prob ve filtre seçimi doğru yapılmaz ise hatalı ve zaman alıcı denemeler ortaya çıkmaktadır [18, 19].



Şekil 2. Floresan *in situ* hibridizasyon prosedürü

Şekil 2’de görüldüğü gibi floresan *In situ* hibridizasyon tekniği de birtakım işlemler gerektirmektedir. Metafaz kromozomları veya interfaz nükleusu kullanılarak preparatların hazırlanması gerekir. Etanol içinde dehidrasyonun ardından 70°C’de DNA denatüre edilir. Etiketli probun denatürasyonu ile birlikte hibridizasyon için 37°C’de 4-16 saatlik inkübasyon süreci uygulanır [20].

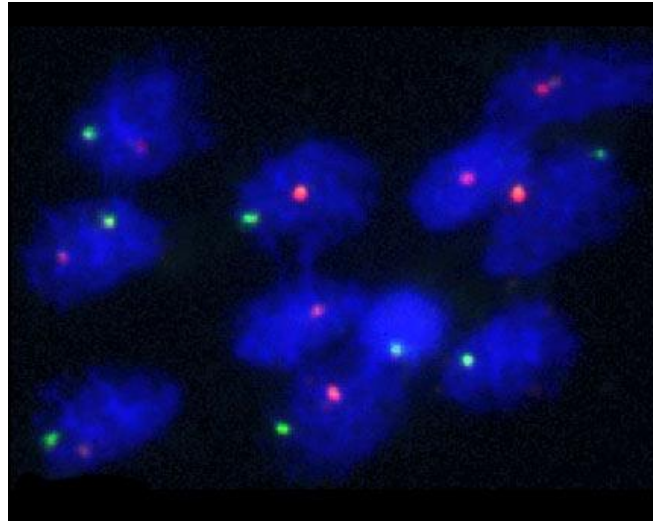
FISH metodunu temel alan bazı uygulamalar geliştirilmiştir:

#### A. SPEKTRAL KARYOTİPLEME

Bir floresan *In situ* hibridizasyon çeşidi olan spektral karyotiplemede teknik, her biri 5 florokromun çeşitli varyasyonları ile hazırlanmış 24 farklı prob ile 24 kromozomun aynı zamanlı melezlemesi ve floresan mikroskobu ile görüntülenmesine dayanır. Bu yöntem ile 31 değişik hedefin ayırt edilebilmesi sağlanır. Preparasyonda aynı zamanda metafaz plağındaki tüm kromozomların farklı renklerde görüntülenmesi mümkündür. Işınım emisyonlarının ölçülmesi hibridizasyonun değerlendirilmesine olanak sağlar. Kromozomlar kendine ait farklı karakteristik bir dalga boyunda veya floresansta izlenir. Spektral karyotipleme ile 1,5 megabazdan daha düşük parça değişimleri saptanabilmektedir. Kansere yol açan genom değişimleri klinik bantlama yöntemlerine oranla daha hassas bir şekilde anlaşılabilir. Kromozomda veya nükleik asit dizilerinde meydana gelen yeniden düzenlenmeler kolay bir şekilde belirlenebilmektedir [21, 22].

#### B. İKİ RENKLİ FISH

Bir ya da iki farklı prob DNA kullanılması ile bir-renkli veya iki-renkli FISH yapılması mümkündür. İki-renkli FISH analizinde iki farklı prob DNA’sı iki farklı modifiye nükleotitle işaretlenebilir. Bu problemlerin bir arada aynı metafaz kromozomları üzerinde hibridize olması sağlanır. Böylelikle birbirinden bağımsız iki farklı DNA’nın aynı kromozom seti üzerindeki dağılımı ve lokalizasyonu tespit edilebilir. Bu şekilde yapılacak bir analiz başka hiçbir yöntemle tespit edilemeyecek organizasyon ve ilişkiyi belirleme imkanı sağlamaktadır [23].



Şekil 3. İki renkli FISH ile soya metafaz kromozomları üzerinde sitogenetik haritalama

### C. FİBER FISH

İnterfaz evresinde kısalıp kalınlaşmaya yeni başlayan kromatin iplikler kullanılarak DNA fragmentlerinin floresan boylarla etiketlenmesi ile yüksek çözünürlüklü kromozom haritalaması yapılabilmektedir. İnterfaz durumunda birkaç yüz kilobazlık uzaklıkta bulunan etiketler farklı renklerde boylar ile işaretlendiklerinde birbirlerine göre sıralarını belirlemek mümkün olmaktadır. Fiber FISH tekniği ile araştırılan genin etrafındaki genlerin belirlenmesi sonucu o genin orada var olduğu hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir [24].

### D. COBRA FISH

Diğer FISH yöntemlerine benzemekle beraber 4 florokrom kullanılması, 24 kromozomun 12'si bir gruba diğer 12'si diğer gruba ayırabilmesini sağlamasıyla farklılık göstermektedir. İlk grup 3 florokromla hibridleştirilirken, 2. grup ek olarak dördüncü florokrom ile muamelesi yapılır. Bu metod, 5. florokrom için, kollara özgü boyama veya Mulicolor FISH (M-FISH) ile lokusa özgü proba geçiş için kullanılmıştır [25].

### E. R x FISH

Gibbon kromozomları prob olarak kullanılır. Gibbon ve insan kromozomlarının homolojisi yaklaşık % 98 dir. RxFISH ile yalnızca kromozomlar arası parça değişimleri değil, aynı zamanda kromozom içi değişimler de belirlenebilmektedir (delesyon, inversiyon). G-bantlama tekniği ile birlikte kullanıldığında 400 kat daha hassas sonuçlar vermektedir [26].

## III. GENOMİK *IN SITU* HİBRİDİZASYON

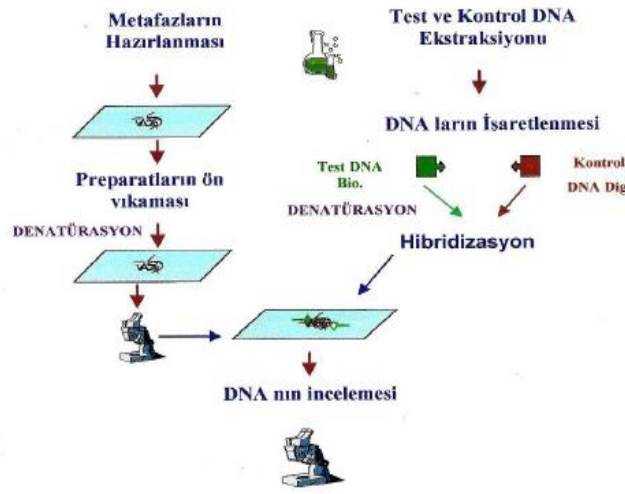
Genom boyunca DNA dizisindeki kopya sayısı değişimlerini inceleyen bir moleküler sitogenetik tekniktir. Bu teknik, kazanım (duplikasyon, insersiyon veya amplifikasyon) veya net kayıp (delesyon) gibi kromozom anomalilerinin sınıflandırılmasına olanak sağlar. Bu yöntem ile kopya sayısındaki farklılıklar ya da iki farklı DNA örneği arasındaki belirli kromozom parçalarının miktarını belirlemek mümkündür ve böylece kromozomlar veya DNA üzerinde monozomik ve trizomik bölgelerin saptanabilmesi mümkün olmaktadır [27].

### A. KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYON (CGH)

İlk defa Kallioniemi ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntem sayesinde kromozomal bozuklukları daha detaylı ve kapsamlı tespit etmek mümkün olmuştur [28]. CGH tekniği; temeli FISH'e dayanan, farklı floresan boya ile boyanmış test (hasta) ve referans DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen floresan renk farklılıklarını gösteren bir sitogenetik yöntemdir. Yöntem ile hasta DNA'sında kromozomal kayıp (loss) veya belli bir bölgenin amplifikasyonu (gain) gösterilir. İki renkli görüntüleme sistemi kullanılması sonucunda metafaz plağı üzerinde kromozom anomalilerinin normal karyotip analizine göre daha güvenilir saptanabilmesi ve en az iki genomun birbirleri ile karşılaştırılmasına olanak sağlaması bakımından M-FISH (Multiplex in situ hibridizasyon 24-renkli karyotipleme tekniği –kromozomlar arası kompleks yeniden düzenlenmeler tespit edilir) yönteminden daha avantajlıdır. Test ve referans hücrelerden genomik DNA eldesi ve elde edilen DNA örneklerinin farklı renkte florokromlarla [Cy3 (yeşil) ve Cy5 (kırmızı)] işaretlenmesi, art arda tekrarlanan bölgelerden kaynaklanabilecek hatalı eşleşmeleri önlemek için insan Cot-1 DNA ile muamelesi,

normal hücrelerden metafaz plağı eldesi ve denatürasyonu, farklı renkte florokromlarla işaretli test ve referans hücrelerden elde edilen DNA materyalleri ile metafaz plağının birlikte melezlenmesi ve son olarak da metafaz plağı üzerinde florokromlardan kaynaklanan renk farklılıklarına göre kromozomlardaki kayıpların veya amplifiye bölgelerin tespiti ile karşılaştırmalı genomik hibridizasyon gerçekleştirilmiş olur (Şekil 4).

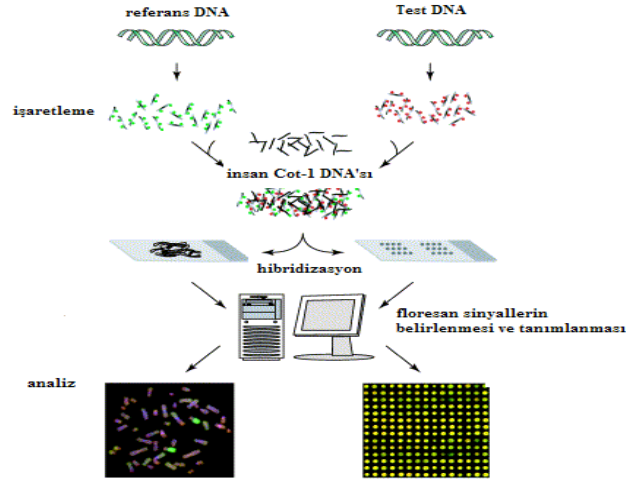
CGH için prob olarak çok miktarda IRS (serpiştirilmiş tekrarlı diziler) içeren genomik DNA kullanılır. IRS'lerden gelen özgün olmayan hibridizasyon sinyallerini baskılamak için DNA problemleri Cot 1 DNA ile kombine edilirler. Kromozomal DNA'nın preparat üzerinde denatürasyonu yeterli değilse iyi bir hibridizasyon elde edilemez. Floresan sinyaller konvansiyonel epifloresan mikroskopi ile izlenir ve uygun bir kamera sistemi ile görüntülenir.



Şekil 4. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon basamakları

## B. ARRAY TEMELLİ GENOMİK HİBRİDİZASYON (CGH)

İlk olarak 1997' de Solinas-Toldo ve arkadaşları hedef diziyi cam matriks üzerine immobilize ederek array temelli genomik hibridizasyon için aşama kaydetmişlerdir [29]. 1999 yılında ise Pollack ve arkadaşları ise array platformu üzerine cDNA dizisini immobilize ederek genom düzeyinde DNA'daki kopya sayısı değişmelerini incelemişlerdir [30].



*Şekil 5. Array temelli genomik hibridizasyon*

Şekil 5’ de görüldüğü gibi bu tekniğin uygulanması ise test ve referans hücrelerden genomik DNA izolasyonu, izole edilen bu DNA materyalinin farklı renkte florokromlarla [Cy3 (yeşil) ve Cy5 (kırmızı)] işaretlenmesi, art arda tekrarlanan bölgelerden kaynaklanabilecek hatalı eşleşmeleri önlemek için insan Cot-1 DNA ile muamelesi, BAC, PAC, kosmid, cDNA, oligonukleotid ve PCR türevli problemlerin cam matriks üzerine immobilizasyonu, melezleme aşaması ve bilgisayar ortamında çeşitli analiz programları ile floresan sinyallerin tanımlanarak sonucun yorumlanması basamaklarından oluşur.

#### IV. SONUÇ

*In situ* hibridizasyon verilerinin doğru bir şekilde analiz edilmesi yöntemin güvenilirliği açısından çok önemlidir. Bu amaçla sonuçların kesinliğini belirlemede bazı kontrollerin yapılması gereklidir. Melezleme aşamasında hedef olmayan nükleik asit dizileri ile problemlerde homolojilerden dolayı istenmeyen sonuçlar ortaya çıkabilir. Ayrıca problemin G-C bakımından zengin bölgeleri ile hedef olmayan nükleik asitler arasındaki melezlemede yanlış sonuç verebilir. Böyle hatalı melezleme reaksiyonlarının önlenmesi için prob dizisinin çok dikkatli seçilmesi ve kontrol problemlerin kullanılması gereklidir.

Hızlı sonuç verme avantajı ile ISH, DNA'nın dizi bilgisiyle kromozom biyolojisi arasındaki ilişkinin anlaşılmasında son derece aydınlatıcıdır. Bu ilişki, özellikle immunofloresan ve FISH ile birleştirildiğinde, gen ekspresyonunun kontrolü ile kromatin yapısının özelliklerini birleştirebilir.

#### V. KAYNAKLAR

- [1] K. Tanaka, A. Mansyur, M. Eguchi, T. Shintani, T.S. Kumaravel, H. Asaoku, T. Kyo, H. Dohy, N. Kamada *Cancer Genet. Cytogenet.* **11(5)** (1999) 32-38.
- [2] D.Y. Lee, H.I. Cho, Y.H. Kang, S.S. Yun, S.Y. Park, Y.S. Lee, Y. Kim, D.S. Lee *Cancer Genet. Cytogenet.* **15(2)** (2004) 1-7.



- [3] S. Fröhling, S. Skelin, C. Liebisch, C. Scholl, R.F. Schlenk, H. Döhner, K. Döhner *J. Of Clinical Oncology* **20** (2002) 2480-2485.
- [4] A. E. Wiktor, D. L. Van Dyke, P. J. Stupca *Genet. Med.* **8** (2002) 16-23.
- [5] F. Forozan, R. Karhu, J. Kanonen *Trends Genet.* **13** (1997) 405-409.
- [6] F. Celep, A. Karagüzel, G.K. Özgür *Eur. Urol.* **44(6)** (2003) 666-671.
- [7] B. Trask *Tech. Focus* **7** (1991) 149-54.
- [8] M. Otano-Joos, G. Mechttersheimer, S. Ohl *Genet. Med.* **10** (2004) 12-18.
- [9] R. Wang, Y. J. Lu, C. Fisher *Genes Chromosomes Cancer* **31(1)** (2001) 54-64.
- [10] K. Han, W. Lee, C.P. Haris *Cancer Genet. Cytogenet.* **74(1)** (1994) 19-24.
- [11] P. Jeffrey, K. North *Am. J Surg. Pathol.* **35** (2011) 1146–1150.
- [12] E. Christine, M. D. Fuller, M. D. Arie Perry *Brain Pathol.* **12** (2002) 67-86.
- [13] M. D. Pedram Geramy *Arch Dermatol.* **146(3)** (2010) 273-278.
- [14] A. K. Zimmermann *Histol. Histopathol.* **25** (2010) 1139-1147.
- [15] P. Gerami, A. Wass, M. Mafee *Am. J Surg. Pathol.* **33(12)** (2009) 1783-1788.
- [16] J. W. Jeuken *Diagn. Mol. Pathol.* **11** (2002) 193–203.
- [17] L. Casorzo, C. Luzzi, A. Nardacchione, F. Picciotto, A. Pisacane, M. Risio *Melanoma Res.* **15(3)** (2005) 155–160.
- [18] F. S. Pala *Trakya Üniv Tıp Fak Dergisi* **22(3)** (2005) 132-136.
- [19] H. J. Holtke, C. Kessler *Nucleic Acids Res* **18** (1990) 5843–5851.
- [20] H. A. John, M. L. Birnstiel, K. W. Jones *Nature* **223** (1969) 582–587.
- [21] R. G. Morris, M. J. Arends, P. E. Bishop, K. Sizer, E. Duvall, C. C. Bird *J Clin Pathol* **43** (1990) 800–805.
- [22] J. Pernthaler, R. Amann *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2002) 3094–3101.
- [23] G. E. A. Kowalchuk, *Molecular microbial ecology*, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, (2006).
- [24] J. Pernthaler, F. O. Glockner, W. Schonhuber, R. Amann *Methods Microbiol.* **30** (2001) 207–226.
- [25] B. Schramm, M. Fuchs, J. L. Nielsen, M. Tonolla, D. A. Stahl *Environ. Microbiol.* **4** (2002) 713–720.
- [26] M. P. C. van de Corput, R. W. Dirks, R. P. M. van Gijlswijk, F. M. van de Rijke, A.K. Raap *Histochem. Cell Biol.* **110** (1998) 431–437.
- [27] N. Başaran, H. Acar, S. Artan, A. Silahtaroglu, *Teorik ve pratik floresan In situ hibridizasyon (FISH)*, Kurs Kitapçığı, (1996).
- [28] A. Kallioniemi, O. P. Kollioniemi, D. Sudar, J. W. Gray, F. Waldman, D. Pinkel *Science* **258(5083)** (1992) 818-821.
- [29] S. Solinas-Toldo, S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Dohner, T. Cremer, P. Lichter *Genes Chromosomes Cancer* **20(4)** (1997) 399-407.
- [30] J. R. Pollack, C. M. Perou, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. S. Jeffrey, D. Botstein, P. O. Brown *Nat. Genet.* **23(1)** (1999) 41-46.