

Edyta Krzymańska-Olejek, Ryszard W. Adamiak
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Poznań

Nieizotopowe metody detekcji DNA i RNA oraz ich zastosowania we współczesnej diagnostyce medycznej i rolniczej.

Część II – Sondy hybrydizacyjne

Powszechnie stosowane w laboratoriach biochemicznych i genetycznych radioizotopowe metody znakowania i detekcji kwasów nukleinowych cechuje duża skuteczność i wysoki poziom czułości detekcji. Posiadają one jednakże szereg wad: ograniczony czasowo okres ich stosowania spowodowany rozpadem radioizotopu, możliwość radiolizy analizowanego materiału czy konieczność wielogodzinnego oczekiwania na wynik autoradiografii. Ponadto izotopy stanowią zagrożenie dla zdrowia personelu stosującego te metody. Ograniczenia te sprawiły, że poszukuje się nowych, nieizotopowych systemów detekcji, które przede wszystkim umożliwiłyby skrócenie czasu detekcji do maksimum 2-3 godzin.

Opracowane do tej pory nieizotopowe systemy detekcyjne wykazują, w zdecydowanej większości, mniejszą czułość detekcji i obciążone są wyższym poziomem tła, niż metody radioizotopowe. Powoduje to, że prowadzi się intensywne prace zmierzające do udoskonalenia metod nieizotopowych. Celem tych prac jest:

- zwiększenie prostoty analizy tak, by można ją było wykonywać w dobrze przygotowanym laboratorium biochemicznym czy medycznym,
- poszerzenie zakresu stosowania, a więc możliwość przeprowadzania rutynowych testów diagnostycznych w tkankach, płynach ustrojowych, organellach komórkowych,
- zmniejszenia ryzyka utraty zdrowia personelu laboratoriów.

Obrazem zwiększającego się zaangażowania firm biotechnologicznych w badaniach wykorzystujących sondy DNA w różnych dziedzinach medycyny, genetyki, biochemii i rolnictwa niech będzie (zamieszczone w tab. 1) zestawienie przewidywanych w 1985 r., obejmujących cały świat, wpływów finansowych z zastosowań sond DNA, przedstawione podczas konferencji pt. "DNA Probes. A new technology in its development and application", która odbyła się w sierpniu 1985 r. w Londynie.

Tabela 1

Perspektywiczne wielkości wpływów płynących z zastosowania sond DNA w latach 1986-1990 (w mln dolarów USA) (1)

Kierunki zastosowań	1986	1988	1990
1) medycyna:			
-diagnostyka chorób zakaźnych,	24	92	330
-poradnictwo genetyczne,	6	21	77
-choroby nowotworowe,	11	48	400
-badania tkankowe,	2	9	50
-testowanie podatności na chorobę	0,08	1,08	25
2) weterynaria	-	11	74
3) rolnictwo	-	-	25
4) analiza żywności	1	4	14
razem	47	188	995

Konfrontacja przedstawionych prognoz z zaawansowanymi w chwili obecnej badaniami upoważnia do wniosku, że najlepiej sprawdziły się one, także w stosunku do metod nieizotopowych, w dziedzinie medycyny, i to zarówno w przeprowadzaniu rutynowych testów diagnostycznych, np. dla chorób uwarunkowanych genetycznie (m.in. dla diagnostyki prenatalnej), jak i w medycynie sądowej (ustalenie ojcostwa, identyfikacja osobnicza). Rutynowe testy weterynaryjne – często objęte patentami – są już prawdopodobnie stosowane, a w przypadku zastosowań na potrzeby rolnictwa przeprowadza się np. testy na wykrywanie obecności wirusów w materiale roślinnym.

W tej części artykułu autorzy pragną przedstawić podstawy, często dostępnych już handlowo, nieizotopowych systemów detekcyjnych i wskazać przykłady ich zastosowań.

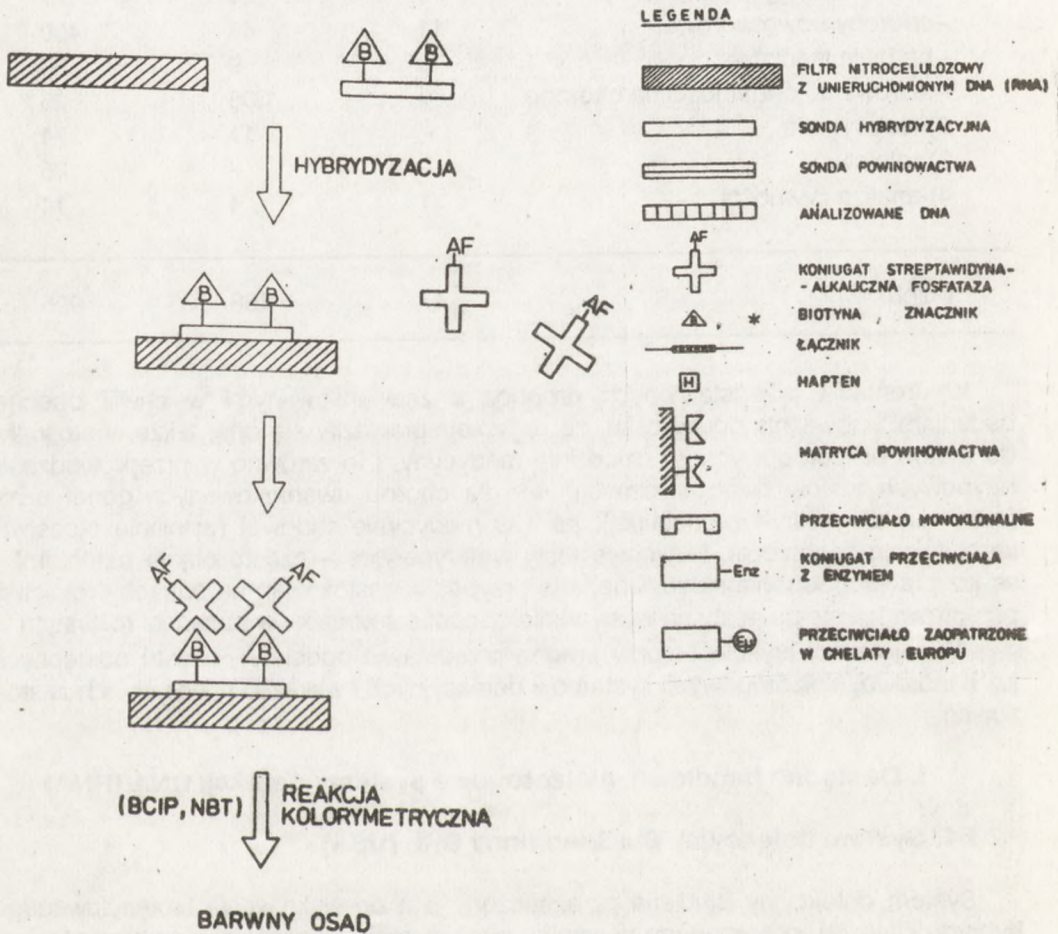
I. Dostępne handlowo, nieizotopowe systemy detekcji DNA (RNA)

I.1. System detekcyjny BluGene firmy BRL (USA)

System detekcyjny BluGene przeznaczony jest do wykrywania biotynylowanego hybrydu DNA (2), otrzymanego w wyniku hybrydyzacji, najczęściej z wykorzystaniem filtra nitrocelulozowego. W skład systemu wchodzi:

- koniugat białka streptawidyny z alkaliczną fosfatazą,
- zespół barwników (BCIP-fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indoilu, NBT-fosforan di-2',2'-paranitrofenylo-5',5'-di-fenylo-3,3'(3,3'-dimetoksy-4,4'-difenyleno)-ditetrazoliowy). Obecnie stosowana streptawidyna posiada wysokie powinowactwo do

cząsteczki biotyny i wiąże się z nią wysoce specyficjnie. Jej użycie, w odróżnieniu od awidyny (białka jaja kurzego) nie prowadzi do powstania wysokiego poziomu tła wobec braku zdolności do niespecyficznego wiązania się z innymi białkami, np. z chromatyną. Jest to szczególnie istotne w badaniach przeprowadzanych metodą *in situ* przekrojów tkankowych (3). Zadaniem alkalicznej fosfatazy jest wywołanie reakcji barwnej, która pozwala na wykrycie poniżej 1 pg analizowanego DNA lub pojedynczej kopii genu w przeciągu zaledwie 1 h z próbki o masie 2 µg. Stawia to tę metodę detekcji na jednym poziomie z metodami radioizotopowymi w zakresie czułości i znacznie je przewyższa w dogodności, prostocie i szybkości stosowania (zob. rys. 1).

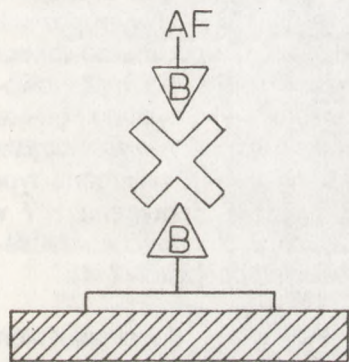


Rys.1. System detekcyjny BluGene, BRL*.

* Dla tego i dalszych rysunków znaczenie symboli wyjaśniono w legendzie.

System detekcyjny BluGene wykorzystano już w szerokim zakresie, wykorzystując takie techniki, jak: hybrydyzacja na filtrze nitrocelulozowym metodą przeniesienia punktowego, hybrydyzacja *in situ*. Obrazuje to szerokie możliwości stosowania tego systemu. Jako przykłady można tu wymienić takie prace jak: detekcja unikatowych sekwencji DNA w ludzkim genomie, odpowiedzialnych za dziedziczenie dystrofii mięśniowej typu Duchenne'a (4); analiza obecności adenowirusa wywołującego infekcję górnych dróg oddechowych, w śluzowej wydzielinie z nosa i gardła (5); identyfikacja DNA we fragmentach tkanek utrwalonych w formalinie (6); a także test na obecność wirusa mozaiki grochu (CMPW) w materiale roślinnym (7).

Opisany w pierwszej części artykułu sposób znakowania kwasów nukleinowych fotobiotyną (firma BRESA, Australia) sprowadza się również do detekcji cząsteczki biotyny w hybrydzie z wykorzystaniem systemu BluGene. Wykorzystanie sond otrzymanych przy użyciu fotobiotyny, jest jednym z nielicznych – jak nam wiadomo – przykładów zastosowania niezotopowych testów na potrzeby rolnictwa, przeprowadzanych z reguły metodą przeniesienia punktowego i przeznaczonych do wykrywania obecności wirusów lub wiroidów, jak np. wiroidu plamistości awokado (ASBV) (8), czy też wirusa żółtej karłowatości jęczmienia (BYDV) z grupy luteowirusów (9) w ekstrakcie roślinnym.



Rys.2. System detekcyjny firmy Amersham.

Ten rodzaj testu wykorzystujący sondy znakowane fotobiotyną zastosowano do wykrycia pojedynczego genu metalotioneiny II A w ludzkim genomie (10), do detekcji wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) (11) oraz rutynowego testu na wykrywanie obecności pasożyta z grupy *Leshmania gamhami*, wywołującego groźne epidemie w krajach tropikalnych (12).

Pewną modyfikację systemu BluGene, zmierzającą do zwiększenia czułości, zaproponowano w firmie Amersham (W. Brytania), która wprowadziła streptawidynę jako mostek łączący dwie biotynolowane cząsteczki: hybryd i alkaliczną fosfatazę (13).

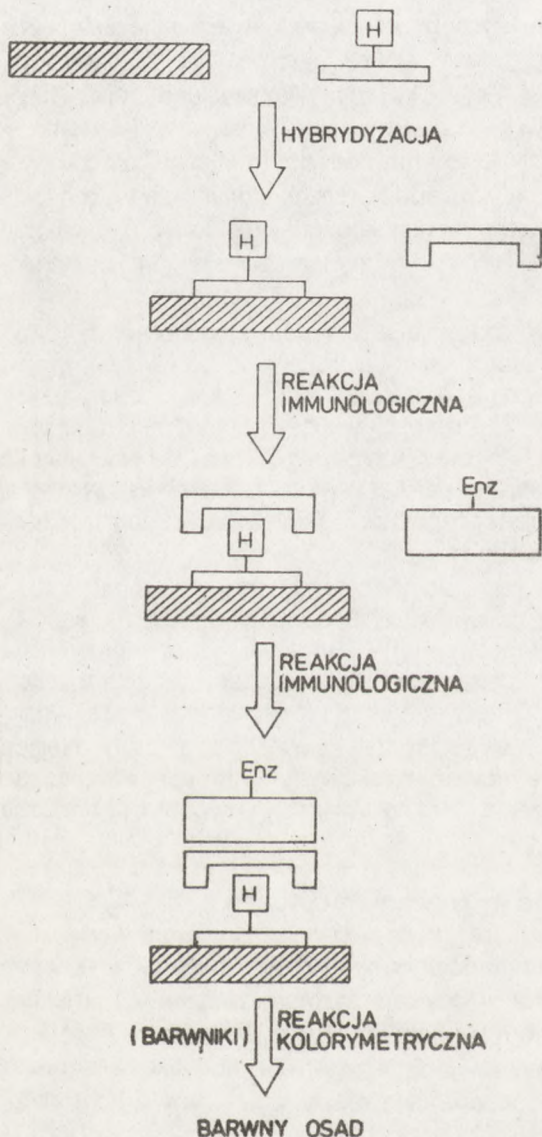
Ponieważ streptawidyna posiada cztery miejsca wiążące biotynę uzyskuje się w ten sposób znaczne zwiększenie intensywności sygnału podczas detekcji.

1.2. Systemy detekcyjne oparte na wykrywaniu haptenu

Systemy tego rodzaju korzystają z immunologicznych metod detekcji, w których odpowiednie przeciwciała monoklonalne wykrywają haptenu związany z makrocząsteczką kwasu nukleinowego. Dostępne handlowo immunologiczne systemy detekcji stosują jako haptenu alkaloid sterydowy digoksygeninę, modyfikowane grupą N-acetoksy-N-2-acetylo- amino-7-jodofluorenową reszty guanozyny lub modyfikowaną pochodną cytozyny.

I.2.1. System detekcyjny Chemiprobe firmy Orgenic (Izrael)

Sondę DNA otrzymano drogą modyfikacji wodorosiarczynem sodu (patrz I część artykułu) i następczej reakcji z O-metylohydroksyloaminą. Hybryd wykrywano za pomocą odpowiedniego układu przeciwciał: a) monoklonalnego przeciwciała specyficznego dla zmodyfikowanej cytozyny oraz b) koniugatu antymysiego przeciwciała poliklonalnego z alkaliczną fosfatazą. Okres inkubacji z przeciwciałami wynosi łącznie około 2 h. Detekcja enzymu alkalicznej fosfatazy odbywa się analogicznie jak w teście BluGene – zestawem barwników (BCIP/NBT) (14) – (zob. rys. 3).



Rys.3. System detekcyjny Chemiprobe firmy Orgenic.

Omówiony system detekcyjny oparty o hybrydyzację na filtrze nitrocelulozowym pozwala wykrywać 0,3 pg analizowanego DNA w czasie 2-3 h. Z powodzeniem wykorzystano go do detekcji wirusa *Herpes simplex* typu 1 i 2 (14), onkogenu typu Ha-ras (14) i antygenu HIV w węzłach chłonnych zainfekowanych pacjentów (14).

Pewnym udoskonaleniem tego systemu detekcji jest propozycja firmy Orion (Finlandia) (patrz rozdz. II).

1.2.2. System detekcyjny firmy Boehringer Mannheim Biochemica (RFN)

Rolę haptenu spełnia digoksygenina związana z sondą DNA poprzez reszty cytozyn (w chronionej patentem procedurze nie wskazano chemicznej drogi modyfikacji haptenu). Detekcja odbywa się przez inkubację hybrydu z przeciwciałem monoklonalnym specyficznym dla digoksygeniny, związanym z enzymem β -galaktozydazą i wykrywanie tego ostatniego w reakcji barwnej z czerwienią chlorofenylową (15). Test pozwala wykryć 1 pg analizowanego DNA, zarówno w hybrydyzacji na filtrze, jak i w przeniesieniu punktowym czy metodą *in situ*. Ostatnio system ten w zmodyfikowanej formie zastosowano w nieizotopowej wersji (16) metody *DNA-fingerprint* (metoda opierająca się na fakcie istnienia rozproszonych, unikatowych sekwencji w genomie ludzi i zwierząt; obraz elektroforogramu materiału genetycznego poddanego działaniu enzymów restrykcyjnych jest tak charakterystyczny dla danego osobnika, jak obraz linii papilarnych). Metoda ta umożliwia np. ustalanie więzów pokrewieństwa między różnymi osobami.

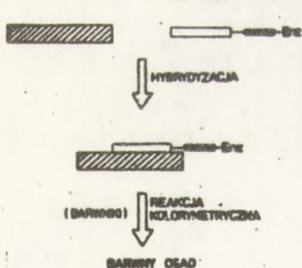
1.2.3. System detekcyjny opracowany w Instytucie Pasteura (Francja)

System detekcyjny oparty jest na modyfikacji reszt guanozyny w sondzie DNA (rRNA) N-acetoksy-N-2-acetyloamino-7-jodofluorenonem (AAIF), który jest wykrywany przez specyficzną króliczą immunoglobulinę. Przeprowadzona następnie inkubacja z immunoglobuliną antykróliczą skoniugowaną z alkaliczną fosfatazą umożliwia detekcję poprzez reakcję barwną z opisanym już wyżej układem barwników (BCIP/NBT) (17). Czulość metody określono na 2 pg analizowanego DNA lub rRNA. Metoda ta nie cieszy się dużą popularnością ze względu na właściwości rakotwórcze odczynnika AAIF, używanego do modyfikacji.

1.3. Systemy detekcyjne wykorzystujące białka enzymatyczne wbudowane w strukturę sondy hybrydacyjnej

W tego rodzaju systemach detekcyjnych kwas nukleinowy jest bezpośrednio związany przez odpowiedni łącznik z enzymem odpowiedzialnym za wywołanie reakcji barwnej. Najczęściej stosowane enzymy to alkaliczna fosfataza lub peroksydaza z chrzanu.

Systemy detekcyjne opracowane przez Molecular Biosystem Inc. (USA) (18) i European Molecular Biology Laboratory (RFN) (19) różnią się w zasadzie tylko rodzajem użytego łącznika (zob. rys. 4).



Rys.4. Systemy detekcyjne wykorzystujące koniugat białko- kwas nukleinowy jako sondę.

W pierwszym, korzysta się z dwufunkcyjnego reagenta pozwalającego koniugować enzym, poprzez grupę aminową, z oligonukleotydem zaopatrzonym w łańcuch poliwęglowy, niosący grupę aminową (patrz I część artykułu). W drugim (19), wykorzystuje się w tym celu aldehyd glutarowy, a sam enzym wyposaża w

dotatkowe grupy aminowe w reakcji p-benzochinonu i polietylenoiminy. Czułość detekcji jest podobna i sięga 5 pg, łączny czas detekcji – wraz z procedurą hybrydyzacji – nie przekracza 4 h. Metodę tę zastosowano w wykrywaniu mutacji punktowej w obrębie ludzkiego genu kodującego interferon α_2 (20).

1.4. Systemy detekcji bezpośredniej

Ostatnio dokonano znacznego postępu w opracowaniu czułych metod analizy fluorymetrycznej. Przykładem będzie tu nieizotopowa analiza sekwencyjna DNA (21,22,23), oparta o metody fluorymetryczne.

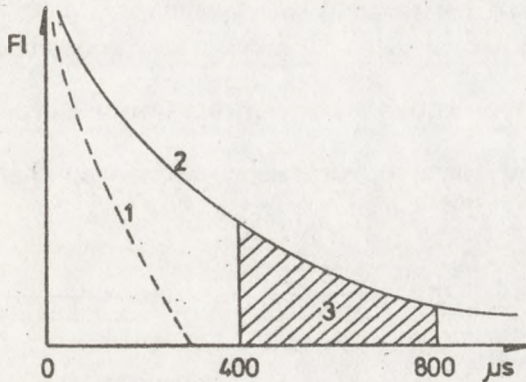
Przedstawione systemy detekcyjne oparte są na bezpośrednim pomiarze fluorescencji czy to na: a) modyfikowanych fluoryzujących nukleotydów wprowadzanych do DNA (jedną z metod enzymatycznych opisanych w I części artykułu), czy b) uzyskanej poprzez przekształcenie chemiczne na poziomie oligonukleotydu wyposażonego w reaktywny łącznik, który umożliwia przyłączenie fluoryzujących reagentów. Najczęściej stosuje się reagenty posiadające wysoką wydajność fluorescencji, takie jak: izotiocyjanian fluoresceiny (21,24) lub tetrametylorodaminy (21), 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (24,25), (N-jodoacetylo-N-5-sulfo-1-naftylo-) etylenodiaminę lub imid N-(1-analinonaftylo-4) kwasu maleinowego (26) i sulforodaminę (Texas Red) (27). Detekcja sprowadza się do pomiaru fluorescencji lub chemiluminescencji, w przypadku zastosowania estru hydroksybursztynowego (N-4-aminobutylo- N-etylo)izoluminolu (27). Praca Horna i wsp. (27) z firmy Chiron Corp. (USA) zawiera zestawienie, w którym zgromadzono osiągnięte poziomy czułości detekcji dla różnych fluoroforów i porównano je z czułością osiąganą dla sond znakowanych radioizotopem lub enzymem (tab. 2).

Tabela 2

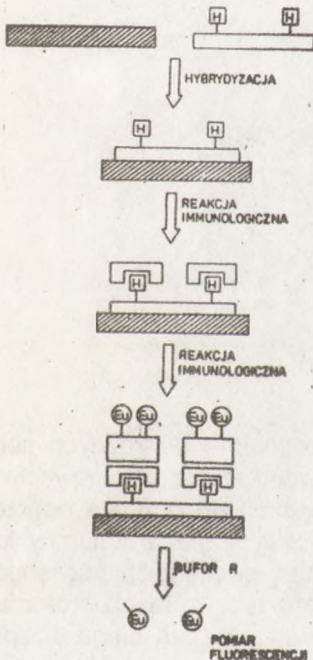
Poziomy czułości detekcji osiągnięte dla sond fluorescencyjnych (27)

Znacznik	Sonda	Po hybrydyzacji
	x 10 ⁻¹⁵ mola	
Fluoresceina	100	500
Texas Red	30	100
Rodamina	20	100
Izoluminol	30	100
Alkaliczna fosfataza (BCIP/NBT)	0,2	0,5
Peroksydaza (O-fenylendiamina)	0,1	0,1
Peroksydaza' (koniugat z izoluminolem)	0,05	0,05
³² P	0,05	0,05

Ostatnim osiągnięciem przy konstrukcji nowego fluorymetrycznego systemu detekcji jest modyfikacja testu Chemiprobe, opracowana przez firmę Orion (Finlandia). W miejsce koniugatu przeciwciała z alkaliczną fosfatazą firma Orion wprowadziła przeciwciało antymysie, modyfikowane resztami EDTA zdolnymi do chelatowania kationów europu. W następczej reakcji z buforem R, niosącym ligand kompleksujący kation europu (2-naftoilotrifluoroaceton) tworzą się intensywnie fluoryzujące chelaty europu, których fluorescencję mierzono za pomocą fluorymetrii czasowo-rozdzielczej (rys. 5).



Rys.5. Zasada pomiaru fluorymetrii czasowo-rozdzielczej. (1-fluorescencja krótkotrwała, 2-fluorescencja długotrwała, 3-zakres pomiaru fluorescencji).



Rys.6. System detekcyjny firmy Orion.

Chelaty lantanowców po wzbudzeniu impulsem światła ultrafioletowego (o długości 340 nm) wykazują dwa rodzaje emisji: krótkotrwałą (stanowiącą tło i zanikającą stosunkowo szybko – 100 μs) i długotrwałą, stanowiącą podstawę pomiaru. Czułość detekcji osiąganę tą metodą jest porównywalna z metodami radioizotopowymi (pozwała wykryć 0,3 pg DNA), a teoretycznie, po zlikwidowaniu problemu tła, jest nawet wyższa (rys. 6).

Metoda ta znalazła praktyczne zastosowanie przy wykrywaniu obecności adenowirusa w śluzowej wydzielinie z nosa i gardła (29,30).

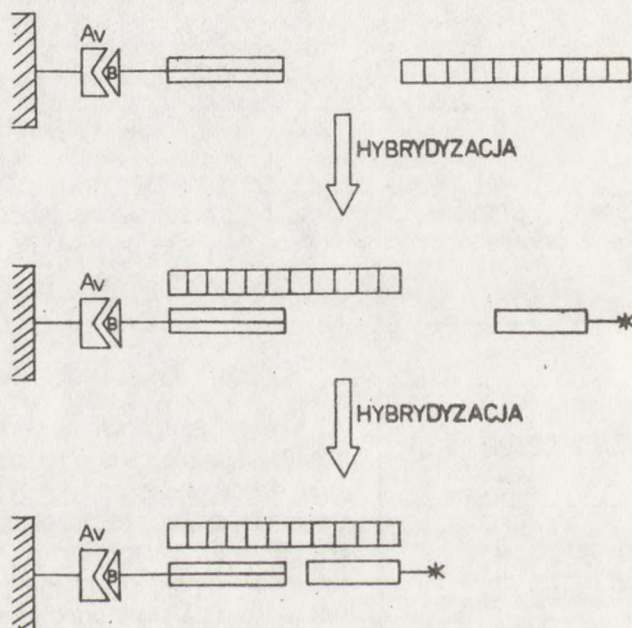
II. Nowe koncepcje hybrydyzacji

Oprócz wymienionych systemów detekcyjnych niektóre z firm biotechnologicznych opracowały nowe koncepcje hybrydyzacji, szczególnie dostosowane do zwiększonych wymagań w zakresie czułości nieizotopowej detekcji kwasów nukleinowych. Poniżej przedstawiono trzy spośród tych koncepcji:

- hybrydyzację typu kanapkowego (z j. ang. *sandwich hybridization*),
- hybrydyzację opartą o metodę sortowania hybrydów,
- hybrydyzację z wymianą łańcucha (z j. ang. *strand displacement*).

II.1. Hybrydyzacja typu kanapkowego (firma Chiron Corp. USA)

Ten rodzaj hybrydyzacji przeprowadza się w dwóch etapach z wykorzystaniem matrycy powinowactwa (27) (rys. 7).

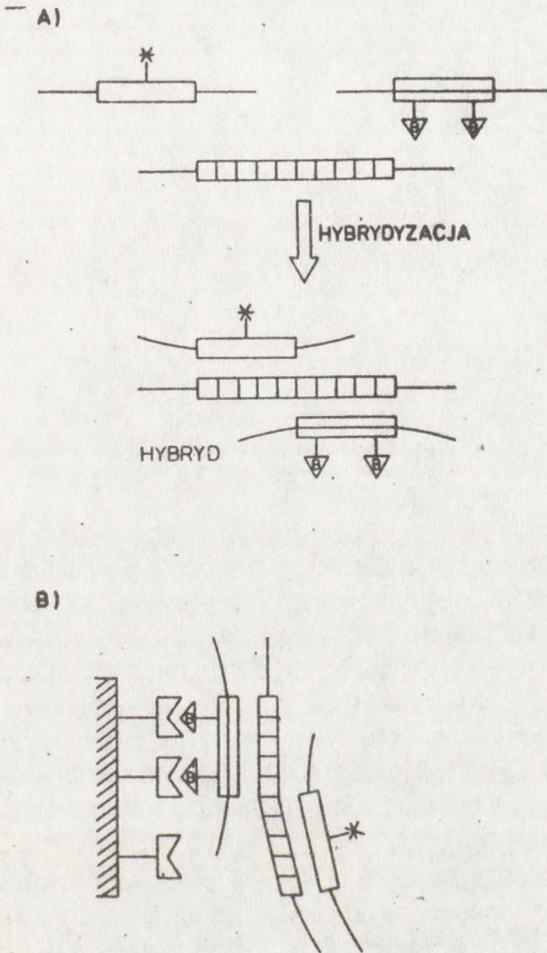


Rys.7. Hybrydyzacja typu kanapkowego.

Konstruuje się dwie niezależne sondy, obie komplementarne do różnych sekwencji w obrębie analizowanego DNA. Pierwsza z nich, zwana sondą powinowactwa, zaopatrzona w cząsteczkę biotyny ulega na stałe przyłączeniu do podłoża poprzez związanie ze streptawidyną (rolę podłoża może spełniać wypełnienie kolumny lub studzienki w naczyniu testowym typu ELISA). Druga sonda, spełniająca rolę sondy detekcyjnej, jest wyposażona w nieizotopowy znacznik (patrz tab. 2), np. fluorofor lub enzym. W pierwszym etapie hybrydyzacji analizowana sekwencja DNA ulega unieruchomieniu na matrycy poprzez sondę powinowactwa, w drugim zaś, z hybrydem wiąże się sonda detekcyjna. Procedura ta pozwala wykryć hybryd przez reakcję barwną lub fluorescencyjnie, z czułością wskazaną w tab. 2.

II.2. Hybrydyzacja oparta o metodę sortowania hybrydów (firma Orion Genetic Engineering, Finlandia)

W metodzie tej wykorzystuje się możliwość hybrydyzacji w roztworze, a jej podstawą jest izolacja hybrydu z roztworu za pomocą podłoża powinowactwa. Wykorzystuje się dwie sondy komplementarne w pewnym zakresie z analizowanym DNA: sondę detekcyjną i biotynylowaną sondę pomocniczą (31) (rys. 8).

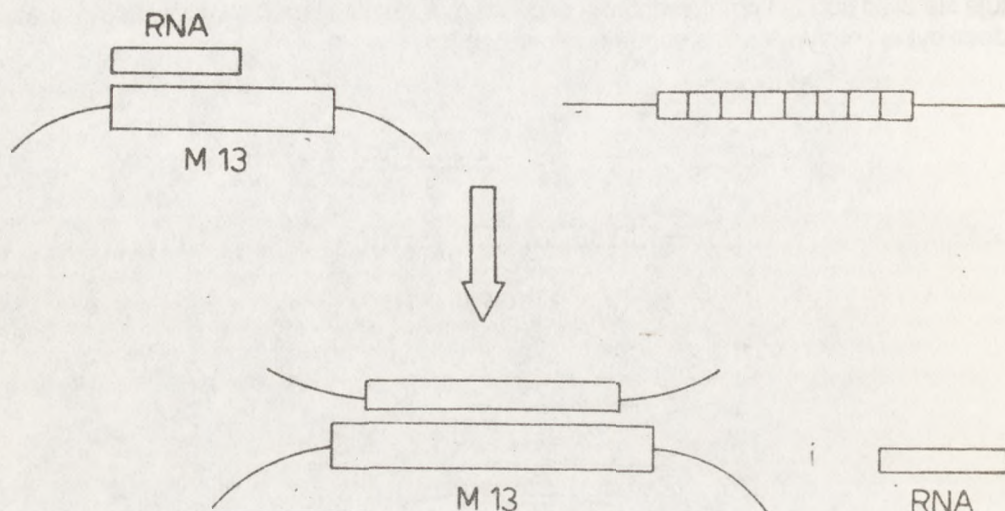


Rys.8. Hybrydyzacja metodą sortowania hybrydów.

Analogicznie jak w przypadku hybrydyzacji kanapkowej w pierwszym etapie tworzy się hybryd z obiema sondami, który z kolei jest wyłowiony przez podłoże powinowactwa (oparte o oddziaływanie biotyna-awidyna lub modyfikowana reszta cytozyny-przeciwciała monoklonalne). Zaletą tej metody będzie możliwość bezpośredniej detekcji DNA w nie oczyszczonych próbkach, np. w materiale roślinnym.

II.3. Hybrydyzacja z wymianą łańcucha (firma Allied-Signal Inc. USA)

Hybrydyzację tego typu przeprowadza się w roztworze. Sondę stanowi hybryd jednoniciowego wektora M13 i fragmentu RNA o długości ok. 150 zasad (rys. 9).



Rys.9. Hybrydyzacja z wymianą łańcucha.

Dodanie do roztworu DNA, który analizujemy, powoduje powstanie hybrydu wektora M13 z analizowanym DNA, z jednoczesnym uwolnieniem łańcucha RNA. Uwolniony RNA spełnia więc rolę jednoniciowej sondy detekcyjnej. RNA w mieszaninie reakcyjnej jest z kolei poddany, w obecności ortofosforanu, działaniu fosforylasy polinukleotydowej rozróżniającej jedno- i dwuniciowy kwas nukleinowy, powodującej rozpad RNA na poszczególne rybonukleotydy. Po etapie enzymatycznej fosforylacji test detekcyjny sprowadza się do wykrycia jednego z rybotrinukleotydów-ATP. Ulega on przekształceniu w AMP wobec enzymu lucyferazy (izolowanego z *Photinus pyralis*), z efektem bioluminescencji, który można mierzyć bezpośrednio (32).

Kończąc omawianie metod nieizotopowej detekcji kwasów nukleinowych wspomnieć należy o metodzie enzymatycznej amplifikacji specyficznych sekwencji genowych (PCR- *polymerase chain reaction*) (33). Jest to metoda - w ostatnich latach bardzo popularna - posługująca się enzymem *Taq* DNA polimerazą, izolowanym z termofilnych bakterii *Thermus aquaticus*. Pozwala ona na powielanie określonej sekwencji DNA, stosunkowo szybko - do milionów kopii w szeregu łańcuchowo następujących po sobie reakcji. Zalety tej metody są szczególnie widoczne przy opracowywaniu testów klinicznych lub w medycynie sądowej (34), gdzie często mamy do dyspozycji wyjątkowo małe ilości DNA (np. po wydzieleniu z paru cebulek włosowych lub skrawków tkanek). Stała się ona w chwili obecnej istotną częścią nowoczesnych systemów diagnostycznych. Wykorzystano ją np. przy analizie DNA

pacjentów wykazujących niedobór α_1 -antytrypsyny (35), a w wersji niezotopowej w prenatalnej analizie anemii sierpowatej za pomocą sondy firmy Cetus (USA), niosącej reszty biotyny i psolarenu (34) (patrz część I artykułu).

Podsumowując, autorzy pragną podkreślić stale rosnące zapotrzebowanie i coraz szersze możliwości zastosowań dla niezotopowych sond DNA i RNA. Dotyczy to zarówno rutynowych testów na potrzeby medycyny (w badaniach chorób zakaźnych, genetycznych, onkologicznych i w medycynie sądowej), jak i rolnictwa, np. w testach wykrywających obecność wirusów czy wiroidów (36).

Literatura

1. Brady M., Materiały z konferencji pt. "DNA probes. A new technology in its development and application", (1985), IBC Technical Services Ltd. & Authors, London.
2. Nonradioactive Nucleic Acid Detection System, Gibco BRL.
3. Langer-Safer P., Levine M., Ward D., (1982), PNAS, 79, 4381.
4. Koch J., Gregersen N., Kolvraa S., Bolund L., (1986), NAR, 14, 7133.
5. Hyypia T., (1985), J. Clin. Microbiol., 21, 730.
6. Brigati D., Myerson D., Leary J., Spalholz B., Travis S., Fong C., Hsiung G., Ward D., (1983), Virology, 126, 32.
7. Al-Hakim A., Hull R., (1986), NAR, 14, 9965.
8. Forster A., McInnes J., Skingle D., Symons R., (1985), NAR, 13, 745.
9. McInnes J., Vise P., Habili N., Symons R., (1987), Focus, 9, 1.
10. McInnes J., Dalton S., Vize P., Robins A., (1987), Bio/Technology, 5, 279.
11. Milde K., Löning T., (1986), J. Oral. Pathol., 14, 292.
12. Trejo P., (1987), Focus, 9, 11.
13. Nucleic Acids Labelling, Amersham.
14. Herzberg M., Reinhartz A., Ritterband M., Twizer S., Smorodinski N., Fish F., (1987), Chimicaoggi, 11, 69.
15. Biochemica dienst, Boehringer Mannheim GmbH, (1986), 65, 3.
16. Schäfer R., Zischler H., Epplen J., (1988), NAR, 16, 9344.
17. Then P., Fuchs R., Sage E., Leng M., (1984), PNAS, 81, 3466.
18. Jablonski E., Moomaw E., Tullis R., Ruth J., (1986), NAR, 14, 6115.
19. Renz M., Kurz Ch., (1984), NAR, 12, 3435.
20. Alves A., Holland D., Edge M., Carr F., (1988), NAR, 16, 8722.
21. Smith L., Fung S., Hunkapiller M., Hunkapiller T., Hood L., (1985), NAR, 13, 2399.

22. Connell C., Fung S., Heiner C., Bridgham J., Chakerian V., Heron E., Jones B., Menchen S., Mordan W., Raff M., Recknor M., Smith L., Springer J., Woo S., Hun-kapiller M., (1987), *Biotechniques*, 5, 342.
23. Smith L., Sanders J., Kaiser R., Hughes P., Dodd C., Connell C., Heiner C., Kent S., Hood L., (1986), *Nature*, 321, 374.
24. Draper D., (1984), *NAR*, 12, 989.
25. Haralambidis J., Chai M., Tregear G., (1987), *NAR*, 15, 4857.
26. Conolly B., Rider P., (1985), *NAR*, 13, 4485.
27. Urdea M., Warner B., Running J., Stempien M., Clyne J., Horn T., (1988), *NAR*, 16, 4937.
28. Kumar A., Tchen P., Rouillet F., Cohen J., (1988), *Analyt. Biochem.*, 169, 376.
29. Syvänen A., Tchen P., Ranki M., Söderlund H., (1986), *NAR*, 14, 1017.
30. Ranki M., Palva A., Virtanen M., Laaksonen M., Soderlund H., (1983), *Gene*, 21, 77.
31. Syvänen A., Laaksonen M., Soderlund H., (1986), *NAR*, 14, 5037.
32. Vary C., (1987), *NAR*, 15, 6883.
33. Mullis K., Faloona F., (1987), *Meth. Enzym.*, 155, 335.
34. Bugawan T., Saiki R., Levenson C., Watson R., Erlih H., (1988), *Bio/Technology*, 6, 943.
35. Newton C., Kalsheker N., Graham A., Powell S., Gammack A., Riley J., Markham A., (1988), *NAR*, 16, 8233.
36. Skrzeczkowski L., Welnicki M., Hennig J., Markiewicz W., Kierzek R., Zagórski W., (1986), *International Seminar "Viroids of Plants and Their Detection"*, Warsaw.

Summary

Non-radioisotopic detection methods of DNA and RNA and their application in contemporary medical and agricultural diagnostics. Part II

In this review we have summarized the principles of commercially available non-radioisotopic detection systems and their application in medical and agricultural studies. We also gave some examples of the latest promising results which are supposed to be used in commercially available detection systems in the near future.

**Ryszard W. Adamiak, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań.**