

Zastosowanie metody losowej amplifikacji DNA techniką PCR w typowaniu molekularnym bakterii

JACEK OSEK

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Osek J.

Application of DNA random amplification method with the PCR technique in molecular typing of bacteria

Summary

Arbitrary amplification (AP), also called random amplification of polymorphic DNA (RAPD), has been widely reported as a rapid, sensitive and inexpensive distinguishing assay for molecular characterization of different microorganisms. The method uses single short primers that target unspecific genomic DNA sequences in order to generate a genetic profile that is unique for the different bacterial isolates tested. Several factors effect the RAPD fingerprints; among them the most important seem to be the annealing temperature, DNA template purity and concentration, primer sequence, as well as the PCR equipment and reagents. These factors can have an influence on the reproducibility and discriminatory power of RAPD-based tests utilized for molecular characterization of related bacteria. However, a precise optimization procedure facilitates sufficiently reliable conditions for using this technique in microbiological laboratories for epidemiological typing of an ever-expanding range of bacteria. There are several commercially available computer programs for RAPD fingerprints which allow simultaneous analysis of agarose gels obtained in different laboratories. The data obtained may bring new opportunities for the comparison of generated RAPD profiles and for further studies on establishing standardized methods and systems for genotypic analyses of microorganisms.

Keywords: molecular typing, RAPD PCR, test conditions, standardization, data analysis

Oznaczanie pokrewieństwa genotypowego patogenych bakterii, izolowanych z różnych przypadków chorobowych, posiada istotne znaczenie dla jednoznacznej identyfikacji czynnika etiologicznego, źródła infekcji, dróg szerzenia się choroby jak też skuteczności stosowanych szczepień profilaktycznych. Jest też istotne dla porównania mikroorganizmów, należących do tego samego gatunku (szczepu, serotypu), wyisobnionych z różnych miejsc i w różnym czasie. Stosowane konwencjonalne (fenotypowe) metody typizacji szczepów bakteryjnych, oparte m.in. na testach ze swoistymi przeciwciałami (typizacja serologiczna) lub na wrażliwości na bakteriofagi (izolacja fagowa), nie zawsze mogą być wykorzystane w praktyce. Wiąże się to np. z brakiem reakcji części szczepów bakteryjnych (*Escherichia coli*, *Mycobacterium avium*, *Salmonella*) z dostępnymi swoistymi przeciwciałami diagnostycznymi czy też nieobecnością u niektórych izolatów swoistych receptorów fagowych. Z tego też względu w ostatnich latach wprowadzono do badań epidemiologicznych szereg metod opartych na ocenie materiału genetycznego typowanych bakterii. Większość z tych technik oparta jest na analizie porównawczej fragmentów bakteryjnego DNA, uzyskanych różnymi metodami i rozdzielonych następnie w żelu agarozowym w stałym polu elektrycznym (15, 17, 26). Pomimo, iż w testach tych uzyskuje się szereg znaczących informacji, pozwalających na molekularne zróżnicowanie

analizowanych drobnoustrojów, ich praktyczne zastosowanie ograniczone jest zwykle dostępnością specjalistycznej aparatury, czaso- i pracochłonnością oraz wysokim kosztem. Z tych też względów, w wielu laboratoriach prowadzone są badania zmierzające do uproszczenia metod typowania genetycznego szczepów bakteryjnych i wprowadzenie ich do rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej. Milowym krokiem w tym kierunku było opracowanie metody amplifikacji *in vitro* fragmentów DNA drobnoustrojów przy pomocy polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). Wykorzystując tę technikę, w 1990 r., niezależnie od siebie, Williams i wsp. (28) oraz Welsh i McClelland (27) opisali metodę typizacji molekularnej drobnoustrojów, opartą na amplifikacji przypadkowych (losowych) fragmentów genomu bakteryjnego, określoną terminem „Arbitrarily Primed” (AP) lub „Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD). Założenie teoretyczne tego testu opiera się na zastosowaniu pojedynczego startera (oligonukleotydu) reakcji PCR, który łączy się losowo (przypadkowo) z mniej lub bardziej homologicznymi sekwencjami bakteryjnego DNA i po amplifikacji *in vitro* prowadzi do wytworzenia określonego profilu genotypowego, pozwalającego następnie na analizę i porównanie poszczególnych izolatów.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono teoretyczne i praktyczne informacje dotyczące reakcji opar-

tych na amplifikacji losowych fragmentów DNA oraz możliwości zastosowania tej techniki w typizacji i różnicowaniu molekularnym szczepów bakteryjnych. Przyjęto, że oznaczenia AP PCR i RAPD PCR są równoznaczne, a podstawowa różnica między nimi polega na długościach używanych starterów DNA, które wynoszą odpowiednio 18-24 zasad (AP) i 9-10 zasad (RAPD).

Zasada testu RAPD (AP) PCR

Istotną różnicą między „klasycznym” testem PCR, stosowanym do amplifikacji określonego fragmentu badanego genu bakteryjnego a analizą opartą na RAPD (AP) PCR jest, że w tym drugim przypadku używany jest zwykle tylko jeden starter DNA, o losowej sekwencji, nie będącej komplementarną do znanego odcinka poddawanego powielaniu *in vitro*. Inaczej mówiąc, do wykonania testu RAPD PCR nie jest konieczna znajomość sekwencji genomu badanego drobnoustroju i dlatego może być on użyty w stosunku do wszystkich bakterii, u których istnieje możliwość izolacji DNA. Stwierdzono, że oligonukleotydy używane do testu AP (RAPD) PCR, zawierające zwykle 40-60% zasad C i G, są w stanie hybrydyzować z mniej lub bardziej komplementarną sekwencją analizowanego DNA, a tym samym zapoczątkować reakcję PCR, zwłaszcza gdy do kilku pierwszych cykli używa się stosunkowo niskiej temperatury przyłączania (1, 3, 7). Tak połączony starter, a ściślej mówiąc wiele jego kopii hybrydujących

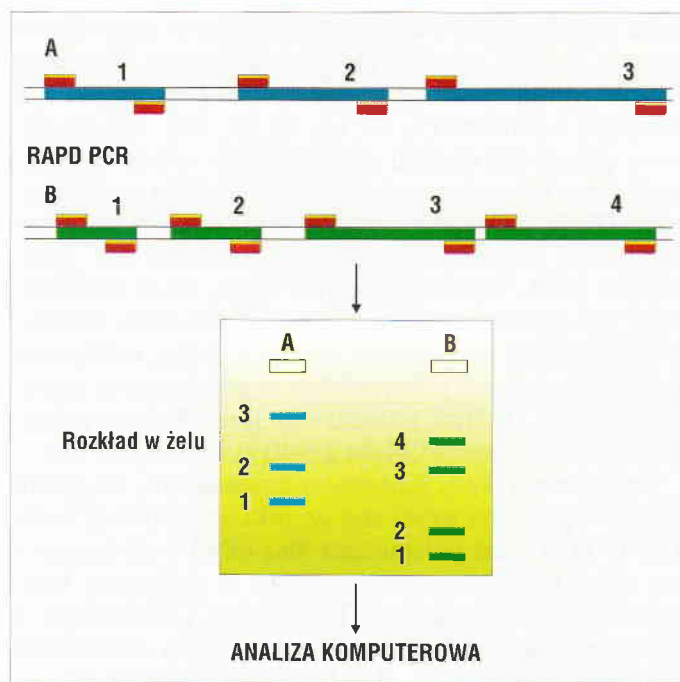
w różnych miejscach podwójnej nici bakteryjnego DNA, pozwala na uzyskanie amplikonów o różnej liczbie i długości, charakterystycznej dla danego drobnoustroju, szczepu lub klonu bakteryjnego. Uzyskany po rozkładzie w żelu agarozowym obraz RAPD PCR, zawiera produkty o różnicowanej masie molekularnej, zależnej od odległości w jakich starter przyłącza się do różnie oddalonych od siebie miejsc analizowanego DNA. Liczba tych prążków może zwykle wynosić od kilku do kilkudziesięciu i powstają one wtedy gdy odległość między miejscami, z których hybryduje starter na przeciwległych niciach matrycowego DNA nie przekracza kilku tysięcy par zasad (1, 3, 15, 21, 24).

Jak stwierdzono wcześniej, startery testu AP PCR nie są całkowicie komplementarne do żadnego specyficznego odcinka genowego i przez to posiadają zdolność hybrydyzacji z różnymi, przypadkowo położonymi sekwencjami analizowanego DNA bakteryjnego. Uważa się, że aby doszło do skutecznej amplifikacji niezbędna jest komplementarność 5-7 zasad oligonukleotydu z matrycowym DNA bakteryjnym (2, 8, 21). Proces ten zależny jest w największym stopniu od użytej w reakcji PCR temperatury przyłączania (annealing), jak również od innych parametrów, które zostaną pokrótce scharakteryzowane.

Czynniki wpływające na wyniki reakcji RAPD (AP) PCR

Startery DNA. Do testu RAPD PCR używa się zwykle oligonukleotydów o długości 9-10 zasad, o dowolnie dobranej sekwencji, unikającej jednak układu palindromowego (27). W wielu pracach wykorzystujących tę technikę genotypowania, podano szereg sekwencji oligonukleotydowych, generujących z bakteryjnym DNA amplikony o różnych masach molekularnych, umożliwiając ich analizę w konwencjonalnym żelu agarozowym. Najczęściej są to startery o sekwencjach: CCGCAGCCAA, GTGGATGCGA, GCGGAAATAG, TCTCACCCTC, CTGGCGGCTG, GCCTGGTTGC lub innych, dobranych i poddanych standaryzacji w poszczególnych laboratoriach (1, 3, 4, 8, 15, 20, 21). Oprócz użycia jednego tylko startera, analiza genotypowa bakterii wykonywana jest także przy udziale dwóch lub trzech starterów RAPD PCR. Uzyskane wtedy wyniki cechują się większą powtarzalnością, a otrzymany obraz elektroforetyczny składa się z większej liczby aplikonów, umożliwiając bardziej dokładną analizę, stanowiącą podstawę różnicowania genotypowego badanych izolatów (1, 15, 20, 24).

W przypadku techniki AP PCR, w której znajdują zastosowanie startery oligonukleotydowe o większej liczbie zasad, występują najczęściej następujące ich sekwencje: TTATGTAACACGACGGCCAGT (starter M13), GGAACAGCTATGACCATG (starter M13r), CCCATGTGTACGCGTGTGGG (starter KZ) lub ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC (starter ERIC1R) (8, 17, 18).



Ryc. 1. Uproszczony schemat metody RAPD PCR, wykorzystanej do analizy pokrewieństwa molekularnego dwóch izolatów bakteryjnych (oznaczonych jako A i B). Pojedynczy starter o krótkiej sekwencji hybryduje losowo w różnych miejscach dwóch nici matrycowego DNA, uzyskanego z izolatów A i B. Otrzymane produkty amplifikacji RAPD PCR, cechujące się odmienną masą molekularną (oznaczone odpowiednio kolorem niebieskim dla szczepu A i zielonym dla szczepu B), są rozkładane w żelu agarozowym, a ich profile analizowane przy użyciu programu komputerowego (wg 24, zmodyfikowane).

Oprócz sekwencji, istotną rolę w metodzie losowej amplifikacji DNA odgrywa długość użytego startera DNA. Najczęściej są to oligonukleotydy o 9-10 zasadach (test określany jest wtedy mianem RAPD PCR) lub też takie, które składają się z ok. 20 zasad (test oznaczany jako AP PCR). Optymalna liczba zasad startera zależy m.in. od badanego drobnoustroju i powinna być dobrana i standaryzowana w lokalnych warunkach laboratorium. Jak wynika z badań własnych i innych autorów (4, 10, 16, 18-20), w przypadku *E. coli* najlepsze wyniki, biorąc pod uwagę ich powtarzalność oraz liczbę i wielkość uzyskanych amplikonów, otrzymano ze starterami o długości 10 zasad, z przewagą cytozyny i guaniny, np. CCGCAGCCAA lub GTG-GATGCGA. Zadawalające rezultaty wykazano też w testach RAPD PCR w przypadku analizy szczepów *Salmonella* z udziałem oligonukleotydów GTT-TCGCTCC lub GTAGACCCGT (5). Do oceny genotypowej innych drobnoustrojów, np. *Toxoplasma gondii*, większe zastosowanie znajdują startery DNA o długości ok. 20 zasad (12).

Duże znaczenie dla optymalizacji metody analizy genotypowej drobnoustrojów, opartej na RAPD (AP) PCR posiada używana w reakcji koncentracja startera, a zwłaszcza jego stosunek do obecnego w mieszaninie PCR matrycowego DNA (6, 12-14). Podobnie jak w poprzednim przypadku, zależy ona od testowanych drobnoustrojów oraz sposobu przygotowania do badań bakteryjnego DNA. Stwierdzono, że zbyt wysoka koncentracja oligonukleotydów prowadzi do amplifikacji krótkich fragmentów DNA, często cechujących się niską koncentracją, które są przez to stosunkowo trudne do końcowej analizy w żelu agarozowym. Dodatkowo, nadmiar startera w stosunku do matrycowego DNA może wpływać na tworzenie się niespecyficznych ich połączeń, a tym samym na generowanie amplikonów nie występujących w optymalnych warunkach amplifikacji (13, 14, 25). Z doświadczeń własnych wynika, że optymalna koncentracja starterów o krótkich sekwencjach powinna wynosić 0,1-0,5 μM w 50 μl mieszaniny PCR zawierającej 10-50 ng izolowanego DNA (16, 18, 19).

Matrycowy DNA. Ilość i jakość materiału genetycznego użytego do reakcji losowej amplifikacji posiada istotne znaczenie dla uzyskania właściwego rezultatu, tzn. liczby i masy produktów reakcji RAPD (AP) PCR. W piśmiennictwie istnieją dane o możliwości zastosowania, jako matrycowego DNA, wodnej zawiesiny komórek bakteryjnych, poddanych działaniu temperatury 95°C przez 10-15 min. (1, 3, 21). Z tak przygotowanym DNA otrzymywano dobre wyniki testu RAPD PCR w przypadku analizy szczepów *Klebsiella*, *Pseudomonas*, niektórych *Escherichia coli*, natomiast inne drobnoustroje, jak np. *Serratia*, *Candida*, wymagały izolowania i oczyszczenia matrycowego DNA (24). Z badań własnych wynika, że do testowania niektórych patogennych szczepów *E. coli* (np. grupy O157) niezbędne jest przeprowadzenie procesu izolacji DNA,

np. przy pomocy szeregu dostępnych handlowo zestawów, oraz jego oznaczenie ilościowe, np. metodą spektrofotometryczną (19). Ten sposób postępowania zapewnia powtarzalność uzyskanych wyników i umożliwia przeprowadzenie badań przez różne laboratoria i w różnym czasie. Dodatkowo, używając izolowanego kwasu nukleinowego zamiast całych komórek, eliminuje się możliwy wpływ nukleaz bakteryjnych lub inhibitorów polimerazy DNA, które mogą powodować degradację matrycowego DNA lub hamować reakcję PCR, a przez to istotnie wpływać na uzyskany obraz RAPD PCR (1, 6, 8, 21).

W większości przypadków podaje się, że optymalna ilość izolowanego DNA, jaka powinna być użyta w testach RAPD PCR, wynosi 10-50 ng (2, 6, 10, 14). Mniejsza koncentracja matrycowego DNA (poniżej 50 pg) zwykle znacząco wpływa na uzyskane produkty PCR, a szczególnie na zmniejszenie liczby prążków o niższych masach molekularnych (12, 13, 24). Podobny efekt obserwowano, gdy do badań używano znacznie większych (powyżej 100 ng w 50 μl mieszaniny reakcyjnej PCR) koncentracji izolowanego i oczyszczonego DNA bakteryjnego (7, 24).

Parametry amplifikacji. Przypadkowa amplifikacja fragmentów DNA, do jakiej dochodzi w trakcie reakcji RAPD PCR, zależy w istotnej mierze od użytej temperatury przyłączania startera DNA. W niektórych testach używa się PCR obejmującej dwie fazy: 3-5 początkowych cykli, o relatywnie niskiej temperaturze przyłączania i często wydłużonym jego czasie (nawet 20-25°C przez 5 min.), a następnie 30 cykli o wyższej temperaturze przyłączania (np. 36-40°C), trwającej 1-2 minut (3, 10, 13, 15, 21, 25). Ten dwufazowy proces ma na celu zainicjowanie reakcji amplifikacji przez łatwiejsze połączenie się startera z matrycowym DNA, uzyskanie szeregu kopii wstępnych, a następnie ich powielenia z użyciem „klasycznych” parametrów PCR. Wykazano jednak także, że ta dwufazowość nie zawsze jest konieczna i równie dobre rezultaty uzyskuje się przy użyciu reakcji z jedną, relatywnie niską temperaturą i jednym czasem przyłączania startera DNA (np. 30-36°C przez 2 min.), wydłużając jednocześnie cały proces PCR do 35-40 cykli (15, 21, 24).

Polimeraza Taq. Kolejnym czynnikiem, mającym istotny wpływ na uzyskane wyniki amplifikacji testu RAPD PCR, jest polimeraza Taq DNA i związany z nią skład buforu enzymatycznego, a zwłaszcza koncentracja jonów magnezu. Tyler i wsp. (25) badając 6 polimeraz Taq pochodzących od różnych dostawców (Promega, Gibco-BRL, Appligene, Boehringer-Mannheim, Stratagene i Perkin-Elmer), stwierdzili znaczne różnice w uzyskanym obrazie produktów amplifikacji oraz występowanie w niektórych przypadkach niespecyficznych amplikonów w próbkach nie zawierających żadnego matrycowego DNA. Obecność tych dodatkowych prążków zależała od koncentracji użytej polimerazy i miała niewątpliwie wpływ na interpretację uzyskanych wyników amplifikacji z udziałem badanego matrycowego DNA bakteryjnego.

Istniejące różnice uzyskiwane w obrazach RAPD PCR po zastosowaniu odmiennych polimeraz mogą wynikać z właściwości i jakości stosowanego enzymu. Niektóre polimerazy Taq, zwłaszcza uzyskiwane bezpośrednio z bakterii *Thermus aquaticus* lub *Thermus thermophilus*, zawierają śladowe ilości innych enzymów modyfikujących, np. odwrotnej transkryptazy. Enzym ten może wpływać na jakość otrzymanych wyników RAPD PCR poprzez tworzenie z RNA obecnego w analizowanym DNA niespecyficznych fragmentów DNA, biorących następnie udział w reakcji amplifikacji z udziałem używanego startera oligonukleotydowego (13, 22, 25).

W badaniach własnych obserwowano także dość duże różnice w liczbie i masie molekularnej amplikonów RAPD PCR, gdy do wykonania testu używano polimeraz Taq pochodzących od IBM Fermentas, Sigma, FinnZyme, Roche lub Eurogenetec. Stwierdzono również, że na stałość i powtarzalność wyników duży wpływ miała koncentracja w mieszaninie reakcyjnej PCR jonów Mg^{+2} . W przypadku polimeraz, dla których dostarczany przez producenta bufor enzymatyczny zawiera już $MgCl_2$ (lub inną sól magnezu), nie ma możliwości zmiany jego koncentracji i optymalizacji RAPD PCR. Z tego też względu, w testach typu AP (RAPD) PCR korzystniejsze efekty uzyskuje się używając polimeraz Taq, których załączony bufor reakcyjny nie zawiera jonów magnezu. Jak wynika z badań wykonanych ze szczepami *E. coli*, optymalne stężenie $MgCl_2$ dla testu RAPD PCR wynosiło w granicach 2-5 mM, dając najbardziej klarowny obraz amplikonów i wysoką powtarzalność wyników (16, 18, 19).

W ostatnim okresie zwiększenie swoistości testów opartych na RAPD PCR uzyskano poprzez zastosowanie handlowo dostępnych, przygotowanych specjalnie do tego testu, polimeraz lub też gotowych mieszanin reakcyjnych PCR, zawierających wszystkie (oprócz matrycowego DNA) komponenty (24). Takie zestawy gwarantują powtarzalność wyników otrzymywanych przez różne laboratoria i są niezwykle pomocne do przeprowadzania badań porównawczych bakterii izolowanych w różnych miejscach i w różnym czasie. Z badań Caetano-Annoleso i wsp. (3) wynika również, iż dużą powtarzalność rezultatów zapewnia mieszanina polimerazy Taq z rekombinowaną, wysoce termostabilną polimerazą określaną jako fragment Stoffela.

Termocykler PCR. Istnieje szereg danych wskazujących, że na powtarzalność i standaryzację wyników reakcji losowej amplifikacji DNA znaczny wpływ ma rodzaj użytego do wykonania reakcji PCR termocyklera (9). Szczególnie dotyczy to starszych modeli, w których regulacja i czas zmiany temperatury poszczególnych cykli przebiegają w dłuższym okresie. Wykazano np., że różnice między próbkami położonymi na obrzeżach i w środku bloku grzewczego mogą sięgać nawet $5^{\circ}C$ (11), ale w obecnych aparatach, posiadających zwykle nowoczesne systemy regulacyjne (np. typu Peltiera) i górną płytę grzewczą, nie jest to większym

problemem. Niemniej, należy liczyć się z uzyskiwaniem odmiennych wyników w badaniach wykonywanych przez różne laboratoria, stosujące termocyklery pochodzące od różnych producentów.

Analiza wyników

Pierwszy etap oceny uzyskanych wyników testu RAPD PCR polega na wykonaniu standardowej elektroforezy produktów w żelu agarozowym. Większość wytworzonych amplikonów PCR obejmuje fragmenty o masie w granicach 100 par zasad (pz) do 2500-3000 pz, które najłatwiej jest analizować w 2% żelu agarozowym. Elektroforezę wykonuje się najczęściej w żelu o długości 10-15 cm, przy stałym napięciu 50-100 V, w buforze TAE lub TBE (17, 24). Istotnym elementem, wpływającym na możliwość standaryzacji i porównania wyników testów uzyskanych w różnym czasie, jest dokładne ustalenie procedur postępowania przed i po wykonanej elektroforezie, tzn. użycie tej samej objętości próbki PCR (zwykle 10-15 μ l) oraz sposobu barwienia (czas, koncentracja bromku etydyyny) i odbarwienia żelu po elektroforezie. Ten ostatni proces odgrywa dużą rolę, gdy obraz elektroforetyczny zawiera amplikony posiadające różną zdolność wybarwienia się (zależną od ich koncentracji) oraz gdy analizowane są próbki badane w różnych żelach, porównywalnych następnie ze sobą.

Obraz elektroforetyczny RAPD PCR można oceniać wzrokowo, oznaczając liczbę i masę molekularną poszczególnych amplikonów (odniesioną do standardu DNA włączonego do każdego żelu), a następnie porównać dane uzyskane dla każdego z badanych szczepów bakteryjnych. Ten sposób interpretacji wyników możliwy jest zwykle przy uzyskaniu 10-15 produktów amplifikacji RAPD (AP) PCR. W przypadku oceny żeli zawierających większą liczbę próbek lub też porównaniu obrazów otrzymanych w różnych żelach agarozowych, bardzo pomocne jest zastosowanie komputera, wyposażonego w odpowiedni skaner i oprogramowanie, pozwalające na akwizycję cyfrowych obrazów w formacie PICT lub TIFF, niezbędnym do dalszej ich analizy. Istnieje obecnie szereg handlowo dostępnych programów komputerowych, pozwalających na przechowywanie i analizę obrazów RAPD PCR, np. Molecular Analyst (Bio-Rad, USA) lub Gel Compar (Applied Maths, Belgia) (17, 23). Umożliwiają one standaryzację (w stosunku do użytych markerów masy molekularnej DNA) uzyskanych w różnym czasie wyników, lokalizację położenia poszczególnych amplikonów, ich intensywność oraz porównują te dane w zakresie wszystkich badanych próbek. Najczęściej stosowaną metodą oceny uzyskanych rezultatów jest test par skojarzonych z zastosowaniem średniej arytmetycznej (UPGMA), z poprawką Jaccarda, Dice lub Pearsona (23, 24). Wynik ten jest podstawą do automatycznego kreślenia drzewa filogenetycznego (dendrogramu), obrazującego (zwykle w procentach) stopień wzajemnej korelacji (pokrewieństwa genotypo-

wego) badanych szczepów bakteryjnych. Interpretacja tych wyników należy jednak zawsze do wykonującego badanie, a określenie sztywnych kryteriów, pozwalających stwierdzić czy testowane drobnoustroje są rzeczywiście różne (i w jakim stopniu), napotyka na szereg trudności. Z większości wykonanych metodą RAPD PCR badań, przy zastosowaniu testu UPGMA wynika, że dla uznania całkowitej różnorodności genotypowej badanych szczepów bakteryjnych niezbędne jest wykazanie różnicy między nimi na poziomie co najmniej 70% (24). Taka wartość eliminuje ewentualne błędy wynikające z poszczególnych etapów reakcji RAPD PCR, analizy żelowej uzyskanych produktów oraz ich oceny z użyciem programów komputerowych.

Podsumowanie

Technika RAPD (AP) PCR, używana do typowania epidemiologicznego szczepów bakteryjnych, posiada szereg istotnych zalet, pozwalających na jej szerokie stosowanie w identyfikacji i określaniu polimorfizmu między blisko spokrewnionymi izolatami: jest stosunkowo łatwa i szybka do wykonania, relatywnie tania i możliwa do przeprowadzenia w większości laboratoriów zaopatrzonych w podstawowy sprzęt do PCR. Cechują ją jednak również pewne ograniczenia, wynikające głównie ze względnie małej powtarzalności uzyskiwanych wyników jak również braku jasnych kryteriów pozwalających na ich interpretację. W trakcie wykonywania testów losowej amplifikacji DNA należy także brać pod uwagę szereg czynników, które potencjalnie mogą mieć wpływ na standaryzację tej procedury typowania molekularnego drobnoustrojów. Należą do nich zwłaszcza: ilość i jakość matrycowego DNA, dobór właściwego dla danego drobnoustroju startera DNA (długość, sekwencja, stopień oczyszczenia, procentowa zawartość zasad C i G), optymalny stosunek molarny matrycowego DNA i startera oligonukleotydowego, właściwa polimeraza Taq (dostawca, seria, obecność/brak fragmentu Stoffela i/lub śladowych ilości odwrotnej transkryptazy), optymalne stężenie jonów magnezu, dobór termocyklera i parametrów reakcji PCR (temperatura przyłączania startera, liczba, czas i temperatura poszczególnych cykli PCR). Mając na uwadze te wszystkie elementy, zmierzające do pełnej standaryzacji metody RAPD (AP) PCR, należy przypuszczać, że znajdzie ona jeszcze bardziej powszechne zastosowanie w szybko rozwijającej się gałęzi mikrobiologii – epidemiologii molekularnej.

Piśmiennictwo

1. Berg D. E., Akopyans N. S., Kersulyte D.: Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Meth. Moll. Cell. Biol.* 1998, 5, 13-24.
2. Caetano-Annoles G., Bassam B. J., Gresshoff P. M.: Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Moll. Gen. Genet.* 1992, 235, 157-165.
3. Caetano-Annoles G.: Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Meth. Appl.* 1993, 3, 85-94.

4. Cave H., Bingen E., Elion J., Denamur E.: Differentiation of *Escherichia coli* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Res. Microbiol.* 1994, 145, 141-150.
5. Chansiripornchai N., Ramasoota P., Bangtrakulnonth A., Sasipreeyajan J., Svenson S. B.: Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000, 29, 221-225.
6. Davin-Regli A., Abed Y., Charrel R. N., Bollet C., De Micco P.: Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.* 1995, 146, 561-568.
7. Gzyl A., Augustynowicz W.: „Przypadkowa amplifikacja” w mikrobiologii – fenomen czy nieporozumienie. *Post. Mikrobiol.* 1999, 38, 61-82.
8. Gzyl A., Augustynowicz W.: Technical aspects of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in genotyping of bacterial strains. *Acta Microbiol. Pol.* 1999, 48, 243-259.
9. He Q., Viljanen M. K., Mertsola J.: Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of binding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Moll. Cell. Probes* 1994, 8, 155-159.
10. Hopkins K. L., Hilton A. C.: Optimization of random amplification of polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 32, 126-130.
11. Linz U.: Thermocycler temperature variation invalidates PCR results. *Bio-Techniques* 1990, 9, 286-294.
12. MacPherson J. M., Eckstein P. E., Scoles G. J., Gajadhar A. A.: Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Moll. Cell. Probes* 1993, 7, 293-299.
13. Meunier J. R., Grimont P. A. D.: Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 1993, 144, 373-379.
14. Muralidharan K., Wakeland E. K.: Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques* 1993, 14, 362-364.
15. Olive D. M., Bean P.: Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 1661-1669.
16. Osek J.: Genetic diversity among *Escherichia coli* O149 : K91 strains isolated from pigs with diarrhoea determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Res. Vet. Sci.* 1999, 67, 197-198.
17. Osek J.: Metody genotypowe różnicowania patogennych szczepów *Escherichia coli* stosowane w epidemiologii molekularnej. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 367-371.
18. Osek J.: Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. *Vet. Microbiol.* 2000, 71, 211-222.
19. Osek J.: Genotypowa charakterystyka szczepów *Escherichia coli* O157 izolowanych w Polsce. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 255-257.
20. Pacheco A. B. F., Guth B. E. C., De Almeida D. F., Ferreira L. C. S.: Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by random amplification of polymorphic DNA. *Res. Microbiol.* 1996, 147, 175-182.
21. Power E. G. M.: RAPD typing in microbiology – a technical review. *J. Hosp. Infect.* 1996, 34, 247-265.
22. Schierwater B., Ender A.: Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucl. Acids. Res.* 1993, 21, 4647-4648.
23. Seward R. J., Ehrenstein B., Grundmann H. J., Towner K. J.: Direct comparison of two commercially available computer programs for analysing DNA fingerprinting gels. *J. Med. Microbiol.* 1997, 46, 314-320.
24. Towner K., Grundmann H.: Generation and analysis of RAPD fingerprinting profiles. W: L. Dijkshoorn, K. J. Towner, M. Struelens (red.): *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. Elsevier Science B. V., Amsterdam 2001, s.135-157.
25. Tyler K. D., Wang G., Tyler S. D., Johnson W. M.: Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 339-346.
26. Van Belkum A.: DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994, 7, 174-184.
27. Welsh J., McClelland M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids. Res.* 1990, 18, 7213-7218.
28. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 1990, 18, 6531-6535.