

karze niedostatecznie przygotowani do tych zadań, a nawet młodzi absolwenci wydziałów weterynaryjnych, którzy nie zdołali wyuczyć się zawodu (Ryc. 5). Rodzi to potrzebę uruchomienia systemu edukacji podyplomowej w omawianym zakresie.

Powyższy pakiet problemów merytoryczno-prakseologicznych nie wyczerpuje zagadnień związanych z reorientacją lecznictwa zwierząt. Trudniejszymi do przezwyciężenia zdają się być stare nawyki, wspomniana rutyna zawodowa, a niekiedy nawet znieczulica i utrata poczucia godności zawodowej. Przepisy państwowej służby weterynaryjnej wkraczały do sfery stosunków między lekarzami i niepostrzeżenie rugowały poczucie potrzeby postępowania etycznego. Ściśle wyznaczone rejon działania nie preferowały lepszych, a precyzyjnie określona, aczkolwiek merytorycznie często nieuzasadniona hierarchia funkcji i stanowisk tworzyła złudzenie o moralnej nieskazitelności środowiska lekarzy weterynarii. Tymczasem malało poczucie odpowiedzialności osobistej, zanikały postawy patriotyczno-zawodowe, powszechnie panował się stereotypowy szablon, a narastające konflikty rozstrzygano decyzjami administracyjnymi o przeniesieniach, karach i awansach (Ryc. 6).

W warunkach, w których nakaz administracyjny zastępował etyczne normy stosunków między ludźmi, roz-

ważania o etyce ograniczały się prawie wyłącznie do zagadnień prakseologicznych. Nie było to naganne, choć dalece niewystarczające. Trudno ganić dążenia do perfekcjonizowania działalności zawodowej, mimo, iż to właśnie teza o potrzebie doskonalenia zawodowego postępu z odgórnym zastępowaniem norm etycznych przepisami administracyjnymi, przyczyniła się do kryzysu postaw etycznie nienaganych. Mówiono przecież w przeszłości o potrzebie „szerzenia etyki i kultury zawodowej na drodze oddziaływań ideologiczno-wychowawczych”, nie zaś — jak to proponuje Tarczyński — o potrzebie tworzenia postaw i zachowań dających poczucie dobrze spełnionego obowiązku moralnego.

Reasumując pragnę wyrazić przekonanie, że odzyskanie wolności zawodowej przyczyni się do zasadniczej poprawy efektywności leczenia chorób zwierząt, a umiejętność uzupełniania przesłanek i wskazań ekonomicznych względami humanitarnymi znacznie poprawi naszą zawodową kondycję etyczno-moralną. Skończył się czas pracy lekarzy anonimowych. Nastaje okres pracy lekarzy odpowiedzialnych, gruntownie wykształconych i wrażliwych nie tylko na potrzeby własne, ale przede wszystkim — na cierpienia istot żywych.

Adres autora: prof. dr hab. Bohdan Rutkowiak, ul. Gojawiczyńskiej 4 B m. 27, 80-286 Gdańsk

JACEK KUŹMAK, JADWIGA GRUNDBOECK

### artykuł przeglądowy

## Polymerase Chain Reaction (PCR) — nowa metoda w biologii molekularnej\*)

Zakład Biochemii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Jedną z podstawowych trudności, jaką napotyka się w pracy nad kwasami nukleinowymi, jest niewielka ilość materiału dostępna w badaniach. Pojedynczy gen stanowi bowiem zaledwie 1 pikogram DNA w 1 µg DNA pochodzącym z komórek eukariotycznych. Praktycznie do badania nie nadają się pojedyncze molekuly, lecz ich niezwykle liczne populacje. Dlatego warunkiem swobodnego manipulowania kwasami nukleinowymi jest ich multiplikacja. Proces ten możliwy jest do przeprowadzenia w dwóch systemach — klasycznym, określanym jako klonowanie molekularne, który polega na powielaniu identycznych kopii interesującego nas fragmentu DNA w bakteriach i drugim — znanym jako metoda PCR (Polymerase Chain Reaction), tłumaczona na język polski jako łańcuchowa reakcja polimerazowa lub enzymatyczna amplifikacja DNA. Po raz pierwszy jej zastosowanie do amplifikacji ludzkiego genu, kodującego beta-globinę, zostało opisane w 1985 r. przez Saiki i wsp. (45), chociaż za twórcę koncepcji PCR jest uważany Kary Mullis, pracownik Cetus Corporation (39).

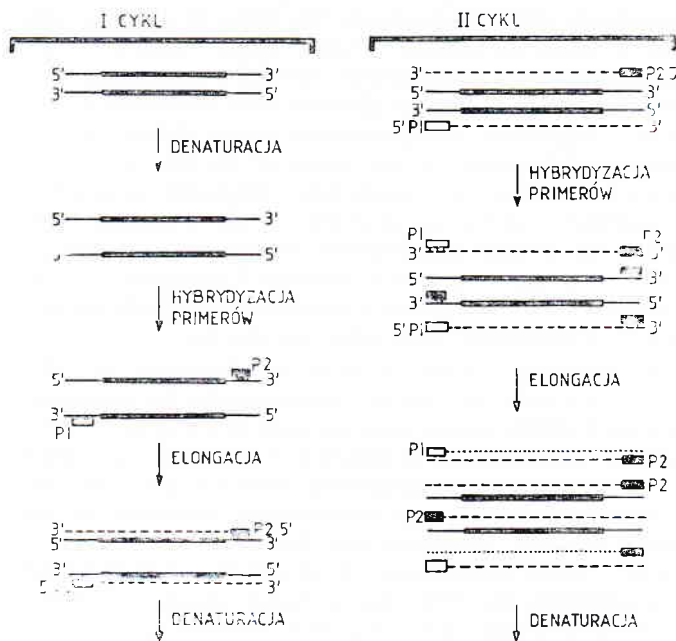
### Mechanizm molekularny PCR

Opis zasady metody PCR wymaga przytoczenia kilku danych na temat budowy i biologii DNA. Jego cząsteczki zbudowane są z czterech rodzajów nukleotydów: ade-

ninowego (A), cytydynowego (C), tymidynowego (T) i guanidynowego (G), których liniowe ułożenie (sekwencja) stanowi informację genetyczną. Nukleotydy spięte są ze sobą przez reszty cukrowe i fosforanowe. W wiązaniu tym biorą udział atomy cukru, dezoksyrybozy, których węgle oznaczane są symbolami 5' i 3'. Dlatego w pojedynczej nici DNA można wyróżnić końce 5' i 3'. DNA występuje zazwyczaj w postaci podwójnych nici, spiralnie skręconych, połączonych wiązaniami wodorowymi. W podwójnej spirali nici ułożone są w sposób antyrównoległy, co oznacza, że naprzeciwko siebie leżą różnoimienne końce (5'—3'). Drugą cechą podwójnej nici DNA jest jej komplementarność, bowiem zawsze naprzeciwko A występuje T, a naprzeciwko C występuje G. W procesie podziału komórki informacja genetyczna zostaje przekazana potomnym komórkom w procesie tzw. replikacji DNA. Podczas tego procesu wiązania wodorowe ulegają przerwaniu i dwie pojedyncze nici stanowią tzw. matrycę służącą do neosyntezy komplementarnych nici potomnych. W ten sposób materiał genetyczny ulega podwojeniu. W procesie tym uczestniczy enzym, polimeraza DNA, przyłączający od końca 3' do 5' poszczególne trójfosforany dezoksyrybonukleotydów.

W metodzie PCR (ryc. 1) wykorzystano opisane zjawisko z tym jednak, że jest to proces o wiele bardziej wydajny, zachodzący *in vitro*, a amplifikacja dotyczy ściśle określonej sekwencji DNA. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu pary syntetycznych oligonukleotydów, komplementarnych do końców sekwencji 5' i 3', która

\*) Referat wygłoszony na IX Kongresie PTNW w Olsztynie.



Ryc. 1. Zasada metody PCR (opis w tekście)  
 P1 — pierwszy primer, P2 — drugi primer

ma być uzyskana w wielokrotnej liczbie kopii. Oligonukleotydy te pełnią rolę tzw. primerów, czy też starterów, rozpoczynających reakcję syntezy. Sama polimeraza bowiem nie jest w stanie rozpocząć syntezy i wymaga do utworzenia pierwszego wiązania fosfodwustroowego obecności pewnego, krótkiego fragmentu DNA (primera). Jeden z nukleotydów jest komplementarny do nici kodującej o orientacji 5'—3', drugi, odpowiednio do nici niekodującej, o orientacji 3'—5'. Związanie primera z nicią 5'—3' (tzw. hybrydyzacja) zdenaturowanego, a więc jednoniciowego DNA, po którym następuje wydłużenie (elongacja) przez polimerazę DNA, doprowadza do powstania nowej nici o orientacji 3'—5' zawierającej żadaną sekwencję. Równoległe na drugiej matrycy zachodzi analogiczna reakcja doprowadzająca do powstania nici o orientacji 3'—5', zawierającej również żadaną sekwencję. Reakcje te są cykliczne, po pierwszej syntezie następuje ponowna denaturacja, hybrydyzacja primerów i elongacja nici DNA. Elementy te obejmują jeden cykl PCR. W każdym następnym cyklu teoretycznie następuje podwojenie liczby syntetyzowanych kopii danej sekwencji. Zależność tę opisuje wzór:  $Y = 2^n$ , gdzie Y — oznacza liczbę kopii, n — liczbę cykli. Teoretycznie po 20 cyklach liczba kopii wynosi 10 048 516. W rzeczywistości efektywność syntezy jest niższa i po 25—30 cyklach, co rutynowo jest stosowane, można otrzymać  $10^6$  —  $10^7$  kopii (55); odpowiada to około 0,5—1,0  $\mu\text{g}$  DNA. Warunkiem ciągłego przebiegu reakcji są cykliczne zmiany temperatury, jakim poddawana jest mieszanina reakcyjna. Najczęściej denaturację przeprowadza się w 94—95°C, przez 40—60 sek. W pierwszym cyklu trwa ona zwykle 5—7 min. ze względu na konieczność denaturacji długich, podwójnych nici DNA. Właściwa temperatura hybrydyzacji jest kluczowym punktem w metodzie PCR. Zwykle na podstawie zawartości zasad purynowych i pirymidowych w primerach oblicza się tak zwaną temperaturę topnienia ( $T_m$ ), przy której następuje denaturacja kompleksu primer-matryca. Temperatura hybrydyzacji powinna być oczywiście niższa od  $T_m$ , lecz z drugiej strony, zbyt łagodne warunki hybrydyzacji zwiększają

prawdopodobieństwo formowania niespecyficznego kompleksu primer-matryca i nieswoistych amplifikacji. Hybrydyzację przeprowadza się zwykle w temperaturze 55—65°C przez 20—40 sek. Optymalną temperaturą dla elongacji jest 72°C. Osiągnięcie tych warunków jest możliwe przez wykorzystanie tzw. termocyklerów, urządzeń mogących pomieścić od 20 do 30 probówek, w których programuje się zakresy temperatur i liczbę cykli. Standardowo amplifikację przeprowadza się przez 25—30 cykli w probówce typu Eppendorf o poj. 0,5 ml w objętości 50  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej, na którą składają się: roztwory primerów i fosforanów dezyksorybonukleozydów (dNTP), matryca DNA, polimeraza DNA z buforem.

### Komponenty reakcji

Primery. Dobór sekwencji primerów jest kluczowy dla całego przebiegu reakcji; decyduje bowiem o lokalizacji amplifikowanego fragmentu i amplifikacji. Optymalna długość primerów waha się od 20—30 nukleotydów. Ważna jest zawartość zasad G + C, która powinna być większa niż 50%, co ze względu na trzy wiązania wodorowe między C i G zapewnia lepszą hybrydyzację. Sekwencje primerów powinny być tak dobrane, aby na ich końcach 3' nie było sekwencji komplementarnych, bowiem umożliwiają to amplifikację nieswoistych dimerów typu primer-primer. Także duża zawartość wielu G i C tzw. poly G lub poly C może powodować ich nieswoistą hybrydyzację. W przeciwieństwie do tego, na końcach primerów 5' możliwe jest wprowadzenie dowolnych sekwencji nie wpływających na przebieg reakcji. Można w ten sposób kreować nowe miejsca restrykcyjne, przydatne w procesie klonowania. Po raz pierwszy możliwość tę wykorzystali Scharf i wsp. (46) do klonowania fragmentu genu beta-globiny ludzkiej. Długość amplifikowanego fragmentu, określana dystansem między primerami, zawiera się najczęściej w przedziale od 100—2000 par zasad (pz), chociaż ostatnio Maga i wsp. (36) opisali amplifikację fragmentu 9000 pz, kodującego beta-kazeinę bydła.

Matryca DNA. Najczęściej do badań używany jest genomowy DNA uzyskany metodą ekstrakcji fenol-chloroform i precypitacji etanolem. W przypadku amplifikacji DNA z leukocytów krwi istotne jest całkowite usunięcie erytrocytów, bowiem pochodne hemu są silnymi inhibitorami polimerazy DNA (17). Matrycą w metodzie PCR mogą być również pełne lizaty komórkowe uzyskane przez poddawanie komórek temperaturze 100°C (11, 43) lub otrzymane przez lizę komórek niejonowymi detergentami (7). Klasycznie, stosuje się od 100 ng do 1  $\mu\text{g}$  DNA; większe ilości blokują mechanizm reakcji i ułatwiają nieswoiste amplifikacje. Istnieją dane o możliwości amplifikacji DNA ze skrawka tkanki, będącego 40-letnim preparatem histologicznym (49), czy amplifikowaniu specyficznych sekwencji z płaz z krwi (54), śladów naskórka i włosów ludzkich (18). Tę możliwość PCR wykorzystano w medycynie sądowej do identyfikacji osób na podstawie analizy ich DNA. W 1988 r. opublikowano dane o badaniu sekwencji DNA pojedynczej komórki diploidnej i pojedynczego plemnika ludzkiego (20).

Enzym. Niekorzystne efekty używania fragmentu Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* zostały wylimnowane w wyniku użycia przez Saiki i wsp. (44) nowego enzymu, Taq polimerazy, izolowanej z termofil-

nych bakterii *Thermus aquaticus* żyjących w gorących źródłach Yellowstone National Park (8).

Optymalna temperatura dla Taq polimerazy wynosi 72°C. Enzym ten zachowuje aktywność nawet w 95°C. Zwykle stosuje się 2,5 jednostki na reakcję. W tych warunkach szybkość syntezy DNA wynosi 300 nukleotydów na minutę. Istotną konsekwencją wynikającą z prowadzenia Taq polimerazy jest wzrost specyficzności reakcji. Jego termostabilność pozwala bowiem przeprowadzić hybrydyzację primerów nawet w temp. 68°C. W tych warunkach primery związane z matrycą w miejscach od niepełnej komplementarności sekwencji tzw. mismatches oddysocjują, natomiast wiązania utworzone między całkowicie komplementarnymi sekwencjami są trwałe (Kwok i wsp. (31). Pewną niedogodnością stosowania Taq polimerazy jest jej częstsza niż u innych polimeraz możliwość omyłkowego dołączenia innego nukleotydu. Według Gelfanda i wsp. (13) możliwość taka może wystąpić raz na  $5 \times 10^6$  do  $1,7 \times 10^4$  nukleotydów, na jeden cykl.

**Bufor.** Standardowo bufor dla Taq polimerazy zawiera 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 i 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> oraz roztwory 200 μM każdego z dNTP. Parametry te powinny być optymalizowane dla każdego układu reagentów (27). Dotyczy to szczególnie zawartości jonów Mg<sup>++</sup>, niezbędnych dla aktywności polimerazy, których dostępność w reakcji może być zredukowana obecnością ujemnie naładowanych grup fosforanowych pochodzących z dNTP lub obecnością związków chelatujących np. EDTA, który jest składnikiem buforów stosowanych przy preparatyce DNA. Zaznaczyć trzeba, że częstotliwość błędów popełnianego przez polimerazę wzrasta, gdy stężenia Mg<sup>++</sup> i dNTP są wysokie.

### Analiza produktów amplifikacji

Efektywność amplifikacji analizowana jest w prostej metodzie elektroforezy na żelu agarozowym. Po barwieniu bromkiem etydyny, który tworzy kompleksy z DNA fluoryzujące w promieniach lampy UV, produkty amplifikacji widoczne są w postaci intensywnych, pojedynczych prążków. Metodą tą można wykryć około 5 ng DNA. Bardziej precyzyjna ocena amplifikacji, uwzględniająca jej swoistość, polega na hybrydyzacji z sondą molekularną. Jest to odcinek DNA o znanej sekwencji, homologicznej do amplifikowanego fragmentu, zawierający wbudowany izotop lub inny znacznik. W warunkach metody PCR szczególne zastosowanie znalazły tzw. sondy zimne, nieizotopowe, w których produkt hybrydyzacji wykrywany jest immunoenzymatycznie np. sondy znakowane digoxigeniną, biotyną lub bezpośrednio zasadową fosfatazą. Są one od 10 do 50 razy mniej czułe od sond znakowanych izotopem, jednak w warunkach metody PCR, gdzie mamy do czynienia z wydajną amplifikacją, spełniają swoje zadanie (37). Dodatkową zaletą tego systemu jest bezpieczeństwo posługiwania się materiałem nieizotopowym, długi okres ważności sondy, łatwość w użyciu.

Hybrydyzacja najczęściej wykonywana jest wg metody Southerna (51), która polega na elektroforetycznym rozdziale fragmentów po amplifikacji i przeniesieniu DNA z żelu na filtr nylonowy lub nitrocelulozowy. Znacznym uproszczeniem tej dość czasochłonnej procedury jest metoda „dot-blot” lub „slot-blot”. W przeciwieństwie do tego systemu hybrydyzacji, prze-

biegającego na fazie stałej, nową formą analizy jest hybrydyzacja w środowisku płynnym i wykrywanie produktów PCR w mikropłytkach testowych typu ELISA. System ten pozwala na wykrycie amplifikowanego fragmentu równocześnie w licznych próbach w ciągu 30 min., podczas gdy przy klasycznym systemie hybrydyzacja trwa od 4 do 16 godzin (32, 38).

### Zastosowanie PCR

Przykłady zastosowań PCR podzielić można na dwie grupy. Pierwsza obejmuje klasyczną metodę i jej modyfikacje, które znalazły zastosowanie jako nowe techniki badawcze, względnie jako metody uzupełniające klasyczne techniki stosowane w biologii molekularnej.

**Metoda zdegenerowanych primerów.** Metoda wykorzystująca fakt degeneracji kodu genetycznego, stosowana do amplifikacji fragmentów o nieznanej sekwencji DNA, a znanej sekwencji aminokwasów, które tworzą białko kodowane przez ten fragment. Do reakcji używa się mieszaniny primerów, wykorzystując znajomość kodonów najczęściej wykorzystywanych dla danego aminokwasu. Opisano zastosowanie tej metody do identyfikacji retrowirusów (35) oraz do wykrywania i różnicowania szczepów wirusa BVDV (53).

**Zakotwiczona PCR.** Metoda stosowana w przypadkach, gdy znana jest sekwencja tylko jednego primera. Postępowanie obejmuje syntezę komplementarnego cDNA przy pomocy znanego primera, dołączenie za pomocą enzymu terminalnej transferazy, do końców 3' lub 5' końcowej sekwencji, polimerazy (dG) i właściwą amplifikację z użyciem drugiego primera o sekwencji komplementarnej do polimerazy (dG) tj. polimerazy (dC). Metodę zastosowano między innymi do badania rzadkich transkryptów np. genu int-2 myszy (12).

**Sekwencjonowanie DNA.** Wysoka specyficzność PCR z użyciem Taq polimerazy umożliwia wykorzystanie tej metody do bezpośredniego oznaczania sekwencji nukleotydów w metodzie enzymatycznej wg Sangera. W układzie tym stosuje się różne stężenie primerów, co umożliwia syntezę fragmentów jednoniciowych. Primer, o orientacji identycznej do tego, który jest w mniejszym stężeniu wykorzystywany jako primer do sekwencjonowania. Zaletą tego systemu jest znaczne uproszczenie techniki sekwencjonowania w porównaniu do klasycznego systemu z bakteriofagiem M13. Metodę tę z powodzeniem zastosowano do sekwencjonowania fragmentu genu beta-globiny ludzkiej (16).

**Przygotowanie sond molekularnych.** Powyższy system amplifikacji jednoniciowych fragmentów DNA przy użyciu różnych stężeń primerów, tzw. asymetryczna PCR, został wykorzystany do szybkiej produkcji sond molekularnych. W procedurze tej jeden z dNTP zostaje zastąpiony przez nukleotyd znakowany P<sup>32</sup> lub np. digoxigeniną (dig-dUTP). Metoda jest szczególnie polecana do produkcji krótkich sond o wysokiej aktywności specyficznej (47), mających zastosowanie np. w hybrydyzacji *in situ*.

Drugi obszar zastosowań PCR to wykorzystanie tej metody w celach diagnostycznych, w diagnostyce chorób genetycznych i chorób o podłożu zakaźnym.

W diagnostyce chorób genetycznych uwarunkowanych mutacjami, PCR stworzyła możliwość bezpośredniego wykrywania defektywnych alleli genów. Jeżeli miejsce podlegające mutacji zawiera sekwencję roz-

poznawaną przez enzym restrykcyjny, wystarczy zamplifikowany DNA pociąć tym enzymem. Odcinek amplifikowany na matrycy zmutowanego DNA oczywiście nie podlega trawieniu. Inną techniką uwzględniającą PCR, jest metoda ASO (Allele Specific Oligonucleotide), która polega na przygotowaniu dwóch oligonukleotydów o sekwencji komplementarnej do sekwencji normalnej i zmutowanej w danym genie. Oligonukleotydy te, po znakowaniu, służą jako sondy do hybrydyzacji z odcinkiem amplifikowanym na matrycy zmutowanego DNA. Warunki hybrydyzacji są tak dobrane, że sondy wiążą się tylko z identycznymi sekwencjami, natomiast brak komplementarności nawet jednego nukleotydu uniemożliwia ich przyłączenie. Metody te znalazły zastosowanie do diagnostyki B-talosemii (4), anemii sierpowatej (44, 56) i hemofilii (50). Dodatkową zaletą użycia metody PCR jest to, że te techniki badawcze mogą być stosowane w diagnostyce prenatalnej, gdzie do amplifikacji DNA wykorzystuje się kilka komórek płodu, pochodzących z biopsji trofoblastu (10, 26). Ta niezwykła właściwość PCR umożliwia, na etapie życia płodowego, określanie płci człowieka (55). Ostatnio Grobet i wsp. (15) opisali takie postępowanie do określania płci u bydła.

Wprowadzenie PCR do diagnostyki chorób zakaźnych otworzyło nowe możliwości diagnostyczne, oparte o amplifikację i analizę genomu czynnika zakaźnego. W tym celu, po raz pierwszy, wykorzystano PCR do wykrywania wirusa HIV (28). W powodzeniu tej metody decydujące znaczenie ma jej olbrzymia czułość. Naif i wsp. (40) wykazali, że metodą PCR można wykryć prowirusowy DNA wirusa BLV nawet w 1 pg genomowego DNA, co stanowi ekwiwalent DNA jednej komórki, natomiast Leib i wsp. (33) stwierdzili obecność pojedynczych kopii DNA wirusa HSV w pojedynczych komórkach zainfekowanych myszy.

Opisano liczne przypadki stosowania PCR w diagnostyce zakażeń wywoływanych między innymi przez bakterie: *Treponema pallidum* (6), *Aeromonas hydrophila* (41), *Clostridium difficile* (24), *Borella burgdorferi* (14), *Listeria monocytogenes* (21) oraz wirusy: BVDV (5, 48), BLV (40), FIV (19), HBV (23), Epsteina-Barra (42), koński herpes wirus typ 1 (2), wirus choroby Aujeszkyego (21) oraz niektóre adenowirusy (1). W przypadku wirusów RNA konieczny jest wstępny etap odwrotnej transkrypcji, której produkt, cDNA, służy jako matryca do właściwej amplifikacji. Ostatnio wykazano jednak, że sama Taq polimeraza zdolna jest do odwrotnej transkrypcji (22) i że możliwa jest bezpośrednia amplifikacja transkryptów przez ten sam enzym (52).

Obecnie obserwuje się znaczny postęp doskonalenia metody PCR w kierunku ograniczenia czasu przygotowania matrycy (szybkie metody otrzymywania DNA, wykorzystanie lizatów komórkowych) oraz szybkiej identyfikacji produktów amplifikacji (hybrydyzacja w środowisku płynnym, zimne sondy oligonukleotydowe).

Poważnym zagrożeniem dla PCR jako czulej i swoistej metody diagnostycznej jest możliwość amplifikacji DNA, który przypadkowo zanieczyścił badaną próbę, co doprowadza do nieswoistych amplifikacji. Zastosowana ostatnio przez Longo i wsp. (34) metoda z inkorporacją dUTP zamiast dTTP i trawienie produktów amplifikacji glikozydazą uracylową (UDG) jest skutecznym środkiem eliminującym tę niedogodność. Kwok i wsp. (30) opisują całe schematy postępowania i wykonywa-

nia reakcji mające na celu wyeliminowanie reakcji nieswoistych.

Wydaje się, że PCR z jej wielokierunkowym zastosowaniem, jest aktualnie potężnym narzędziem badawczym na miarę rozwoju biologii molekularnej u schyłku XX wieku.

#### Piśmiennictwo

- Allard A., Girones R., Juto P., Wadell G.: J. Clin. Microbiol. 28, 2659, 1990.
- Ballaği-Pordany A., Klingeborn B., Flensburg J., Belak S.: Vet. Microbiol. 22, 373, 1991.
- Bessensen M., Luo Q., Rotbart H., Blaser M., Ellison R.: Appl. Environ. Microbiol. 22, 373, 1990.
- Blood, 73, 372, 1989.
- Boye M., Kamstrup S., Dalsgaard K.: Vet. Microbiol. 29, 1, 1991.
- Burstain J., Grimpler E., Lukehart S., Norgard M., Radolf J.: J. Clin. Microbiol. 29, 62, 1991.
- Carothers A., Urlaub G., Mucha J., Grundberger D., Chasin L.: Biotechniques 7, 494, 1988.
- Chien A., Edgar D., Trella J.: J. Bacteriol. 127, 1550, 1976.
- Conway B., Adler K., Bechtel L., Kaplan J., Hirsch M.: J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. 3, 1059, 1990.
- Embury S., Scharf S., Saiki R., Gholson M., Goibus M., Erlich H.: N. Engl. J. Med. 12, 655, 1987.
- Ferre F., Garduno F.: Nucl. Acids Res. 17, 1989.
- Frohman M., Dush M., Martin G.: PNAS 85, 8998, 1988.
- Gelfand D., White T.: PCR protocols, 129, Academic Press 1990.
- Goodman J., Jurhovich P., Kramber J., Johnson R.: Infect. Immun. 59, 269, 1991.
- Grobet L., Schwers A., Charlier C., Marcq F., Hanset R.: Ann. Med. Vet. 136, 119, 1992.
- Gyllenstein U., Erlich H.: PNAS, 7652, 1988.
- Higuchi R.: PCR technology; principles and application, 31-38, Stockton Press, 1989.
- Higuchi R., Beroldingen G., Sensabough G., Erlich H.: Nature 332, 543, 1988.
- Hohdatsu T., Yamada M., Okada M., Fukasawa M., Watanaba K., Koyama H.: Vet. Microbiol. 30, 113, 1992.
- Honghua L., Gyllenstein U., Cui X., Saiki R., Erlich H.: Arnheim N. Nature, 335, 414, 1988.
- Jestin A., Foulon T., Pertuiset B., Blanchard P., Labourdet M.: Vet. Microbiol. 23, 317, 1990.
- Jones M., Foulkes N.: Nucl. Acids Res. 20, 8387, 1989.
- Kaneko S., Miller R., Bisceglie A., Feistone S., Hoofnagle J., Purcell R.: Gastroenterology 99, 799, 1990.
- Kato N., On C., Kato H., Bartley S., Brown V., Dowell V., Ueno K.: J. Clin. Microbiol. 29, 33, 1991.
- Kogan E., Doherty M., Gitschier J.: N. Engl. J. Med. 317, 985, 1987.
- Krawetz S., Pon R., Dixon G.: Nucl. Acids Res. 17, 319, 1989.
- Kwok S., Mack D., Mullis K., Poiesz B., Ehrlich G., Blair D., Friedman-Klein A., Sninsky J.: J. Virol. 61, 1690, 1987.
- Kwok S., Higuchi R.: Nature, 339, 237, 1989.
- Kwok S., Kellog D., McKinney N., Spasic D., Goda L., Lenson C., Sninsky J.: Nucl. Acids Res. 18, 999, 1990.
- Larzul D.: Biofutur 7, 36, 1989.
- Leib D., Coen D., Bogard C., Hicks K., Yager D., Tyler K., Schafer P.: J. Virol. 63, 759, 1989.
- Longo M., Berninger M., Hartley J.: Gene 93, 125, 1990.
- Mack D., Sninsky J.: PNAS, 85, 6977, 1988.
- Maga E., Richardson T.: Biotechniques, 185, 1992.
- Matthews J., Uricka L.: Anal. Biochem. 169, 1, 1988.
- Mickerson D., Kaiser R., Lappin S., Stewart J., Hood L., Landegren U.: PNAS, 87, 8923, 1990.
- Mullis K., Faloona F.: Methods Enzymol. 1983.
- Naif H., Brandon R., Daniel W., Lavim M.: Vet. Microbiol. 25, 117, 1990.
- Pollard D., Johnson W., Lior H., Tyler S., Rozee K.: J. Clin. Microbiol. 28, 2477, 1990.
- Rouah E., Rogers B., Wilson D., Kirkpatrick J., Buffone G.: Human Pathol. 21, 545, 1990.
- Saiki R., Bugawan T., Horn G., Mullis K., Erlich H.: Nature, 324, 163, 1986.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H.: Science 239, 487, 1988.
- Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., Arnheim N.: Science, 230, 1350, 1985.
- Scharf S., Horn G., Erlich H.: Science 233, 1076, 1988.
- Schwalter D., Sommer S.: Anal. Biochem. 177, 90, 1989.
- Schroeder B., Balassu-Chan T.: Arch. Virol. 111, 239, 1990.
- Shibata D., Martin J., Arnheim N.: Cancer Res. 48, 4564, 1988.
- Stomski R., Reiss J., Jungerman M.: Act. Bioch. Pol. 36, 311, 1989.
- Southern E. M.: J. Mol. Biol. 98, 503, 1985.
- Tse W., Gorget B.: Gene 88, 293, 1990.
- Ward P., Misara V.: Am. J. Vet. Res. 52, 1231, 1991.
- Wiii M.: Biotechnologia 3-4, 127, 1991.
- Wong C., Dowling R., Saiki R., Higuchi H., Erlich H., Kazian J.: Nature, 330, 384, 1987.
- Wu D., Ugozzoli L., Pal B., Wallace R.: PNAS, 86, 2757, 1988.

Adres autora: dr Jacek Kuźmak, ul. Kościuszki 12/4, 24-100 Puławy