

Metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA (RAPD)

Ladan, Paola

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:991774>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij

Biotehnologija

Paola Ladan

7544/BT

**METODA SLUČAJNOG UMNAŽANJA POLIMORFNE
DNA (RAPD)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Molekularna genetika

Mentor: Prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA (RAPD)

Paola Ladan, 0058212353

Sažetak: Danas su u primjeni mnoge metode koje se osnivaju na metodi PCR (Polymerase Chain Reaction, lančana reakcija polimerazom), a jedna od njih je RAPD-PCR ili RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA, metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA). Reakcijske otopine za provođenje metode PCR i metode RAPD sadrže iste komponente, ali uvjeti provođenja reakcije su različiti. Metoda PCR se koristi za umnažanje točno određenog dijela DNA iz nekog genoma, a metodom RAPD umnaža se veći broj različitih fragmenata DNA. Stoga se usporedbom RAPD profila (umnoženih fragmenata) može donijeti zaključak o srodnosti analiziranih organizama odnosno postojanju polimorfizama u njihovim genomima. Glavne prednosti metode su niska cijena i kratko vrijeme potrebno za provođenje analize, a mana je što jako male promjene u uvjetima reakcije mogu značajno utjecati na reproducibilnost rezultata analize.

Ključne riječi: DNA, PCR, polimorfizam

Rad sadrži: 26 stranica, 7 slika, 2 tablice, 27 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Pomoć pri izradi: Ivona Marjanović, mag. ing.

Datum obrane: 15. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) method

Paola Ladan, 0058212353

Abstract: Many methods based on PCR (Polymerase Chain Reaction) are being used nowadays. One of them is RAPD-PCR or RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). PCR and RAPD reaction solutions consist of same components but conditions in which the reaction is carried out differ in these two methods. PCR is used to amplify a specific part of a DNA from a genome, while RAPD enables the amplification of many different DNA fragments. By comparing RAPD profiles (amplified products), a conclusion about similarity between different organisms or the existence of polymorphisms in their genomes can be made. Main advantages of the method are low price and short analysis time, while its disadvantage is the significant influence of reaction conditions on the reproducibility of results.

Keywords: DNA, PCR, Polymorphism

Thesis contains: 26 pages, 7 figures, 2 tables, 27 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Technical support and assistance: Ivona Marjanović, mag. ing.

Defence date: September 15th 2020

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Molekula DNA.....	2
2.1. Građa DNA	2
2.2. Replikacija DNA	2
2.2.1. DNA polimeraze.....	3
3.1. Tipovi polimorfizama.....	4
3.1.1. Polimorfizmi jednog nukleotida	4
3.1.2. Polimorfizmi broja ponavljanja.....	5
3.1.3. Varijacije u strukturi i broju kopija gena.....	5
4. Osnovne karakteristike metode RAPD	6
4.1. PCR	7
4.2. Usporedba RAPD i PCR.....	9
4.3. Usporedba RAPD s drugim metodama	11
4.4. Utjecaj ključnih parametara na RAPD analizu	12
4.5. Prednosti i nedostaci metode RAPD	13
4.6. Analiza i prikaz rezultata	16
4.6.1. Gel elektroforeza.....	17
4.6.2. Interpretacija rezultata RAPD analize	17
4.7. Uređaji i materijali.....	18
5. Primjena metode	19
6. Zaključci.....	23
7. Popis literature.....	24

1. Uvod

DNA polimorfizmi su varijacije u molekuli DNA koje mogu nastati zbog supstitucije, insercije ili delecije jednog ili više nukleotida u molekuli DNA, promjene broja ponavljanja pojedinih sekvenci DNA ili broja kopija određenog gena itd. Polimorfizam je zapravo pojava različitih varijanti nekog gena na točno određenom genskom lokusu. U populaciji se pojavljuje relativno često u odnosu na klasičnu mutaciju pa tako polimorfizmom nazivamo samo one mutacije koje možemo pronaći u više od 1 % članova populacije (Dale i sur., 2012; Teama, 2018).

Razvijene su brojne metode za proučavanje polimorfizama koje mogu dati uvid u promjene koje nastaju unutar organizama na razini DNA, spontano tijekom evolucije ili pak namjernim uvođenjem mutacija, što može biti korisno u brojnim granama znanosti i svakodnevnom životu (veterina, medicina, agrikultura, prehrambena industrija itd.) (Dale i sur., 2012). Jedna od tih metoda je i RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), odnosno metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA.

RAPD se temelji na metodi lančane reakcije polimerazom (PCR, Polymerase Chain Reaction) kojom se dobiva veliki broj kopija željenog odsječka DNA na temelju poznavanja točnog redoslijeda barem dijela nukleotida u istom (Dale i sur., 2012). Korištenje RAPD metode ne zahtijeva poznavanje redoslijeda nukleotida u molekuli DNA koja se umnaža. Karakteriziraju je manje strogi uvjeti reakcije koji omogućuju umnažanje dijelova DNA pomoću početnica čiji redoslijed nukleotida ne mora nužno odgovarati redoslijedu nukleotida lanca kalupa (Power, 1996).

Cilj ovog rada je objasniti osnovne karakteristike RAPD metode i navesti mogućnosti njezine primjene, s naglaskom na njezine prednosti i nedostatke.

2. Molekula DNA

Molekula DNA je osnova razvoja, života i reprodukcije svih živih organizama (Rettner, 2017). To je molekula u kojoj je pohranjen jedinstveni kod svakog organizma koji se u stanicama nalazi u obliku kromosoma te se prenosi na potomstvo. Razlike između organizama proizlaze iz razlika u redoslijedu nukleotida u molekuli DNA i, posljedično, razlika u genima i proteinima (Alberts i sur., 2002).

2.1. Građa DNA

DNA (deoksiribonukleinska kiselina) je dvolančana molekula građena od niza deoksiribonukleotida. Deoksiribonukleotidi (dNTP-ovi) su molekule koje se sastoje od tri dijela: šećera deoksiriboze, jedne od četiri moguće nukleinske baze i fosfatne skupine. Dušične baze koje se nalaze u molekuli DNA dijele se u dvije skupine: purinske baze (adenin i gvanin) te pirimidinske baze (timin i citozin). Ove četiri baze se komplementarno sparuju u molekuli DNA na način da se gvanin povezuje s citozinom preko tri vodikove veze, dok adenin s timinom tvori dvije vodikove veze. Dušične baze jednog lanca određuju redoslijed baza u komplementarnom lancu, dok okosnicu dvostruke uzvojnice DNA čine šećer i fosfatna skupina koji se međusobno povezuju fosfodieterskom vezom (Dale i sur., 2012). Osim komplementarnosti, molekulu DNA odlikuje i antiparalelnost lanaca. To znači da je jedan lanac suprotne polarnosti (usmjerenja) u odnosu na drugi. Polarnost lanaca označuje se oznakama 5' i 3' prema broju ugljikovog atoma šećera na kojem se nalazi promatrana skupina. Na 5' kraju nalazi se fosfatna, a na 3' kraju hidroksilna (-OH) skupina šećera. Dakle, ukoliko se promatraju krajevi antiparalelnih lanaca dvolančane DNA, može se uočiti da jedan od njih završava 5', a drugi 3' krajem (Dale i sur., 2012).

2.2. Replikacija DNA

Proces replikacije DNA podrazumijeva udruženo djelovanje velikog broja enzima. Kao rezultat procesa nastaju dvije nove molekule DNA, a svaka od njih se sastoji od jednog starog i jednog novonastalog lanca. Neposredno prije procesa replikacije potrebno je razdvojiti lance DNA kako bi svaki od njih mogao poslužiti kao kalup za sintezu novih. Ključnu ulogu u ovom procesu imaju DNA topoizomeraze i DNA helikaza. Samu polimerizaciju lanaca provode DNA polimeraze koje karakterizira nemogućnost sinteze molekule DNA „de novo“. Stoga je potrebno najprije sintetizirati kratke RNA molekule sa slobodnom -OH skupinom na 3' kraju, tzv. početnice (primere), koje sintetizira enzim DNA primaza (Alberts i sur., 2002). Replikacija DNA odvija se u strukturi koja oblikom podsjeća na slovo Y i naziva se replikacijskom vilicom, pri čemu DNA polimeraza katalizira polimerizaciju nukleotida u 5'-3' smjeru. Budući da su lanci (kalupi)

međusobno antiparalelni, polimerizacija se na samo jednom od njih može odvijati kontinuirano, dok se drugi, tromi lanac, sintetizira u obliku kratkih Okazaki fragmenata od kojih svaki zahtijeva vlastitu početnicu. Nakon uklanjanja početnica djelovanjem 5'-3' egzonukleazne aktivnosti enzima DNA polimeraze I i sinteze DNA na mjestu gdje je uklonjena RNA, nastali se fragmenti povezuju pomoću enzima DNA ligaze (Alberts i sur., 2002).

2.2.1. DNA polimeraze

DNA polimeraze su enzimi koji kataliziraju produljenje 3' kraja rastućeg polinukleotidnog lanca vezanjem odgovarajućeg deoksiribonukleotida na slobodnu 3'-OH skupinu prema kalupu. Kemijski gledano, reakcija koja se pritom odvija je nukleofilni napad 3'-OH skupine rastućeg lanca na alfa fosfat nadolazećeg dNTP-a i njegova ugradnja u rastući polinukleotidni lanac uz oslobađanje pirofosfata.

Taq polimeraza je DNA polimeraza prvotno izolirana iz termofilne arheje *Thermophilus aquaticus* koja obitava na temperaturama blizu temperature ključanja vode (Dale i sur., 2012). Svojstvo termostabilnosti čini ovaj enzim pogodnim za upotrebu u reakcijskim uvjetima kakvi karakteriziraju RAPD i druge metode temeljene na PCR-u. Bitno je naglasiti kako Taq polimeraza nije jedini termostabilni enzim koji može poslužiti prilikom umnažanja molekule DNA. Naime, ovaj enzim, iako se najčešće koristi, ponekad ne udovoljava zahtjevima analize, npr. u slučaju kada je bitno da se prilikom umnažanja zadrži slijed nukleotida koji u potpunosti odgovara onomu u ishodišnom lancu (Dale, 2012). Taq polimeraza često ne ispunjava ovaj uvjet zbog nedostatka 3'-5' egzonukleazne aktivnosti. Postoji niz termostabilnih komercijalnih polimeraza koje posjeduju ovo svojstvo, a neke od njih su: Pfu (*Pyrococcus furiosus*), Pfx (rekombinantna DNA polimeraza) i Tth (*Thermus thermophilus*) (biocompare.com).

3. Polimorfizmi u molekuli DNA

Polimorfizmi u molekuli DNA predstavljaju njezine dijelove koji se razlikuju između pojedinaca ili većih grupa i populacija. Pritom moraju postojati barem dvije varijante tog dijela molekule DNA. Međutim, ukoliko se razlike unutar promatranog odsječka DNA pojavljuju u manje od 1 % slučajeva, one se ne mogu smatrati polimorfizmom nego mutacijom. Dakle, polimorfizam je pojava barem dviju varijanti nekog odsječka DNA s učestalošću većom od 1 % (Dale i sur., 2012; Teama, 2018).

Polimorfizmi mogu nastati kao rezultat slučajnih mutacija ili mutacija potaknutih nekim mutagenim sredstvom te kao rezultat rekombinacije. Ovisno o njihovoj prirodi i mjestu u genomu na kojem nastaju, oni mogu uzrokovati promjenu fenotipa narušavanjem funkcije

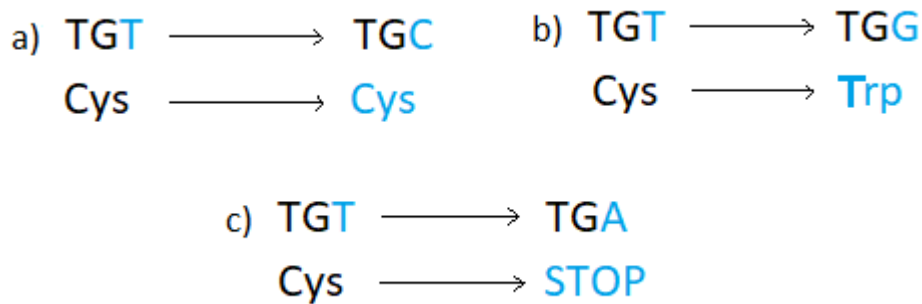
produkta ekspresije gena u kojem je došlo do promjene. Molekula DNA sadrži dijelove koji kodiraju za proteine i molekule RNA i one koji nisu kodirajući te nemaju značajnu ulogu u organizmu (osim nekodirajućih molekula RNA koje imaju regulatornu ulogu). Polimorfizmi se češće pojavljuju u nekodirajućim dijelovima DNA i samim time rijetko dovode do promjene fenotipa (Dale i sur., 2012; Teama, 2018). Vjerojatnost pojave polimorfizama u izravnoj je vezi s duljinom genoma. Stoga ljudski genom, sastavljen od oko 6 milijardi parova baza, sadrži veliki broj polimorfizama. Za neke od njih utvrđen je točan položaj u genomu i time omogućena razna istraživanja u brojnim područjima znanosti (Teama, 2018).

Polimorfizmi su često predmet istraživanja u različitim područjima. Tako njihova analiza ima važnu ulogu u patologiji, farmakogenetici, genealogiji, dijagnostici, forenzici i mnogim drugim područjima znanosti. Utvrđivanje njihove uloge kao genetičkih markera doprinijelo je i razvoju brojnih metoda za njihovo istraživanje. Neke od njih su analiza polimorfizama duljine restrikcijskih fragmenata u kombinaciji s hibridizacijskim metodama, metode koje se zasnivaju na PCR-u, sekvencioniranje i tehnike koje uključuju primjenu čipova (microarray) (Teama, 2018).

3.1. Tipovi polimorfizama

3.1.1. Polimorfizmi jednog nukleotida

Tip polimorfizma koji se najčešće pojavljuje je supstitucija, insercija ili delecija jednog para nukleotida (SNP, single nucleotide polymorphism), a najčešće nastaje kao rezultat pogreške tijekom procesa replikacije. Obično nema utjecaj na fenotip jer se najčešće pojavljuje u nekodirajućim dijelovima DNA. S druge strane, njihova pojava u kodirajućim dijelovima DNA može, ali ne mora nužno dovesti do fenotipske promjene. Naime, zamjenom jednog nukleotida drugim može nastati sinonimni kodon. To je tzv. istovjetna (tiha) mutacija koja ne dovodi do promjene fenotipa budući da nije došlo ni do promjene redoslijeda aminokiselina u nastalom proteinu. Ipak, postoje i slučajevi koji dovode do fenotipske promjene uslijed ugradnje pogrešne aminokiseline u protein (pogrešna mutacija) ili preranog završetka sinteze proteina (besmislena mutacija) (slika 1). Polimorfizmi jednog nukleotida mogu utjecati i na ekspresiju gena ukoliko se pojave u regulatornim regijama. Važno je spomenuti i haplotipove, odnosno polimorfizme iz ove skupine koji se nasljeđuju zajedno i češće uzrokuju bolesti. Ovi polimorfizmi kao čest uzrok bolesti imaju značajnu ulogu u medicinskim istraživanjima kao što su predviđanje bolesti i dijagnostika te u farmakogenetičkim istraživanjima (Teama, 2018).



Slika 1. Polimorfizmi supstitucije jednog nukleotida. a) istovjetna mutacija (silent mutation); b) pogrešna mutacija (missense mutation); c) besmislena mutacija (nonsense mutation).

3.1.2. Polimorfizmi broja ponavljanja

Ponavljajuće sekvence česte su u genomu složenih eukariotskih organizama kao što su životinje i biljke i važan su izvor genetičke raznolikosti zbog mogućnosti varijacija u broju ponavljanja. Mogu biti raspršene u genomu ili se pak radi o uzastopnim ponavljanjima. Također, takve se sekvence međusobno razlikuju svojom duljinom pa tako postoje makrosateliti (sekvence dulje od 100 parova baza), minisateliti (10-100 pb) i mikrosateliti (<10 pb). Ove ponavljajuće sekvence u genomu visoko su polimorfne i samim time pogodne za istraživanja. Osobito su značajni mikrosateliti poznati i pod nazivom kratka uzastopna ponavljanja (short tandem repeats, STRs). Poput polimorfizama jednog nukleotida, oni mogu, ali ne moraju dovesti do fenotipskih promjena, ovisno o tome koje su duljine i na kojem se mjestu u genomu pojavljuju. Najčešće se nalaze u nekodirajućim dijelovima genoma, a u kodirajućim su dijelovima obično duljine 3 pb ili 6 pb, osiguravajući tako izbjegavanje pomaka okvira čitanja redoslijeda nukleotida (Teama, 2018).

3.1.3. Varijacije u strukturi i broju kopija gena

Varijacije broja kopija gena podrazumijevaju svako odstupanje od pravila da svaki gen u genomu diploida dolazi u dvije kopije. Ovo pravilo poznato je od otkrića da svaki diploidni organizam sadrži dva seta kromosoma te samim time po dvije kopije svakog gena. Detaljnijim molekularno-genetičkim analizama utvrđeno je da se pojedini geni u genomu pojavljuju i u više kopija te je omogućeno njihovo korištenje kao genetičkih markera u brojnim istraživanjima (Teama, 2018). Strukturne varijacije pak nastaju bilo kakvom izmjenom strukture kromosoma u procesima inverzije, delecije, duplikacije i translokacije fragmenata DNA koji su u pravilu dulji od 1 kb (Pavlica, 2012; Teama, 2018).

4. Osnovne karakteristike metode RAPD

Metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA je tehnika koja se uglavnom koristi za identifikaciju (mikro)organizama njihovom analizom na razini genoma. Za njezino otkriće 1990. godine zaslužni su Williams i sur., dok su u isto vrijeme, neovisno o njima, Welsh i McClelland otkrili sličnu metodu pod nazivom AP-PCR (arbitrarily primed PCR) (Atienzar i Jha, 2006). RAPD metodom umnaža se više dijelova molekule DNA, a temelji se na metodi PCR (Polymerase Chain Reaction, lančana reakcija polimerazom). Osim RAPD-a, postoje i druge, slične metode, koje se temelje na PCR-u. To su, osim već spomenute metode AP-PCR, DAF (DNA amplification fingerprinting) i REP-PCR (repetitive extragenic elements PCR). Osnovne razlike u provođenju navedenih metoda jesu duljina i koncentracija početnica, temperatura pri kojoj se vežu na kalup, broj ciklusa, princip razdvajanja i vizualizacije te raspon veličine umnoženih fragmenata (Power, 1996; Atienzar i Jha, 2006).

RAPD analizi prethodi izolacija molekule DNA standardnim postupcima, nakon čega se priprema reakcijska otopina s prethodno odabranom početnicom ili više njih, puferom, dNTP-ovima, $MgCl_2$, polimerazom i kalupom DNA, provodi umnažanje pri definiranim uvjetima, razdvajanje umnoženih fragmenata molekule DNA gel elektroforezom, njihova vizualizacija i analiza dobivenih podataka (Arif i sur., 2010; Tofalo i Corsetti, 2017).

RAPD se najčešće provodi s početnicama duljine 10-12 nukleotida (Atienzar i Jha, 2006). Prema nekim autorima, u teoriji nije potrebno koristiti početnice dulje od 8 nukleotida. Ipak, u praksi se to pokazalo netočnim te se metoda pokazala najuspješnijom s početnicama duljine deset i više nukleotida. Treba naglasiti kako to ovisi o samim eksperimentima u kojima su se kao najuspješnije pokazale početnice duljine 8-12 nukleotida (Power, 1996). Početnica koja se koristi u ovoj metodi je sintetski oligonukleotid unutar kojeg slijed nukleotida nije strogo određen slijedom nukleotida u kalupu. To je stoga što, za samu provedbu metode, nije potrebno poznavati redoslijed nukleotida u genomu podvrgnutom analizi (Hadrys i sur., 1992). Variraju i vrijednosti drugih parametara, poput optimalne koncentracije početnica, koju je potrebno eksperimentalno odrediti prije same analize. Temperatura vezanja početnica na kalup DNA iznosi 30 do 36 °C, broj ciklusa 40 do 45, a raspon veličina dobivenih fragmenata 0,3 do 4 kb (Atienzar i Jha, 2006).

Budući da je osnova RAPD metode lančana reakcija polimerazom, potrebno je najprije objasniti osnovni princip njezina odvijanja.

4.1. PCR

Metodu PCR razvio je Kary B. Mullis 1985. godine. Metoda omogućuje umnažanje kratkog odsječka DNA u nizu ciklusa, pri čemu kao konačni proizvod reakcije nastaje relativno veliki broj kopija tog odsječka. Svaki se ciklus sastoji od tri koraka: denaturacija, komplementarno sparivanje/vezanje početnica na kalup i sinteza DNA pomoću DNA polimeraze. Za uspješnost odvijanja ovih koraka ključna je temperatura reakcije. Naime, denaturacija DNA se odvija pri 95 °C, sinteza DNA termorezistentnom DNA polimerazom pri 72 °C, dok temperatura vezanja početnica na kalup može varirati, najčešće u rasponu od 40 °C do 60 °C, iako može biti i viša, ovisno o redosljedu nukleotida u odsječku koji se umnaža, duljini početnica i temperaturi pri kojoj dolazi do disocijacije početnica s kalupa (T_m , melting temperature) (Mathis i sur., 2011; Dale i sur., 2012).

Kalup za sintezu DNA je DNA izolirana iz stanica istraživanog organizma. Nužno je osigurati dvije početnice koje su komplementarne s dijelom molekule DNA koji omeđuje odsječak čije je umnažanje konačni cilj reakcije. Jedna početnica se komplementarno sparuje s jednim, a druga s drugim lancem ishodišne DNA (slika 2).



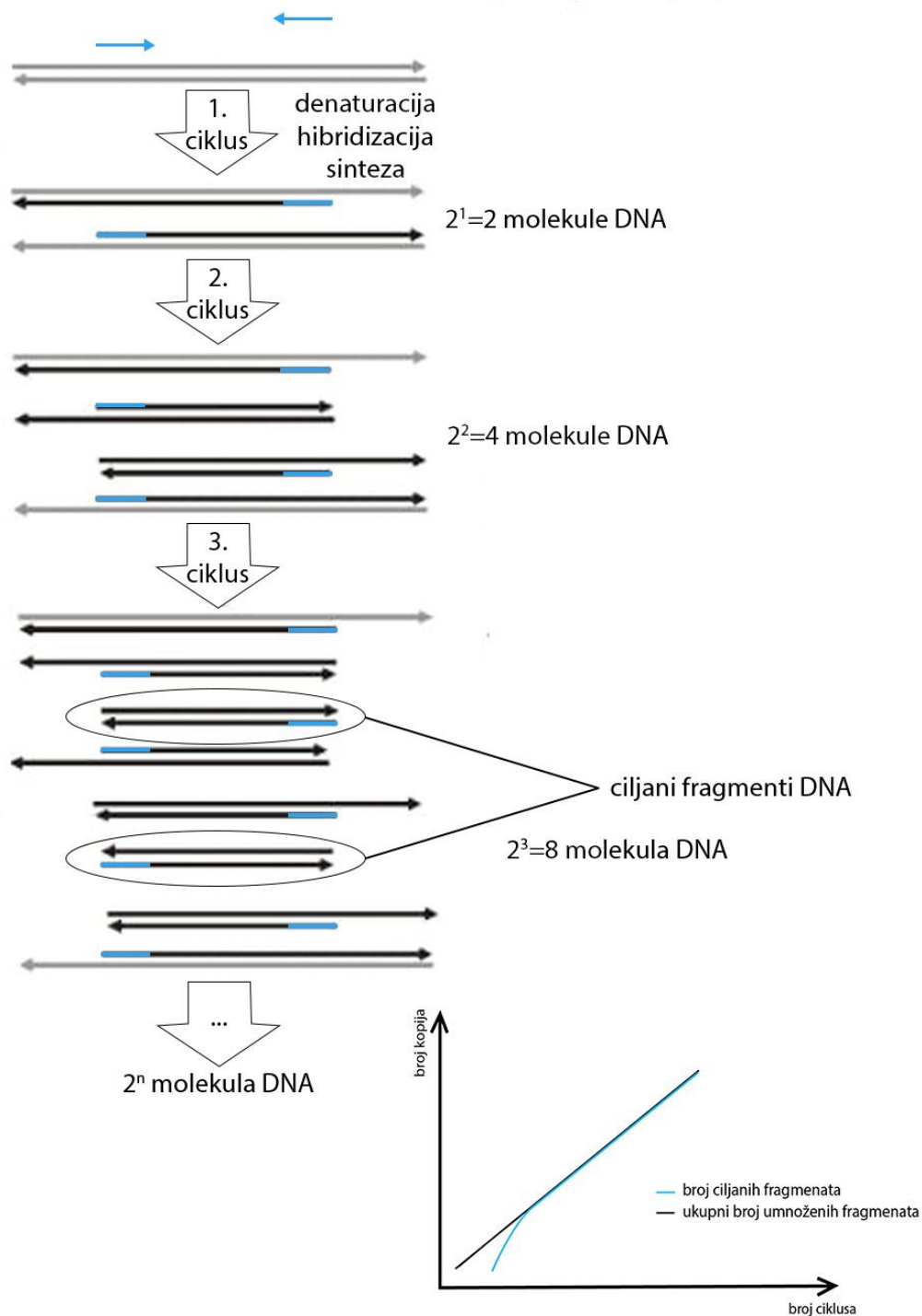
Slika 2. Prikaz vezanja početnica na DNA. Početnice su konstruirane u skladu s polarnosti kalupa i u potpunosti su komplementarne s odgovarajućim dijelom DNA. One se komplementarno sparuju s dijelom DNA koji omeđuje ciljni odsječak DNA (na slici je prikazan tamnijom nijansom plave boje), nakon čega se odvija sinteza u 5'-3' smjeru.

Reakcijska otopina, osim kalupa i početnica, mora sadržavati i odgovarajući pufer, deoksiribonukleotide te termostabilnu DNA polimerazu. Reakcijska otopina se priprema u tubici za koju postoji predviđeno mjesto u uređaju s ugrađenim software-om za namještanje temperature i trajanja pojedinih koraka reakcije te ukupnog broja ciklusa (slika 3) (Dale i sur., 2012).



Slika 3. Thermocycler. Prikazan je uređaj za PCR u koji su umetnute 32 tubice s reakcijskom otopinom (nextdayscience.com).

U prvom se koraku, uslijed povišene temperature, razdvajaju lanci kalupa DNA čime se omogućuje komplementarno vezanje početnica na jednolančanu DNA. To se odvija u sljedećem koraku, nakon hlađenja na odgovarajuću temperaturu. Početnice su sintetizirane tako da se prilikom vezanja na kalup okreću jedna prema drugoj svojim 3' krajem (slika 2). Zagrijavanjem na temperaturu optimalnu za rad termorezistentne DNA polimeraze (72 °C) odvija se sinteza lanaca u 5'-3' smjeru, počevši od početnica, sve do ponovnog zagrijavanja na temperaturu denaturacije (ovo vrijedi samo za lance koji potječu iz početnog kalupa budući da je on značajno dulji od ciljne sekvence, dok se sinteza na novosintetiziranim lancima zaustavlja kad polimeraza dosegne njihov kraj). Kao rezultat prvog ciklusa nastaju dvije molekule DNA, svaka građena od jednog starog i jednog novog lanca. Stoga u sljedeći ciklus reakcije ulaze četiri lanca i kao rezultat nastaju četiri molekule DNA. Iz ovoga proizlazi zaključak da se broj dobivenih molekula DNA u svakom ciklusu povećava eksponencijalno. Dakle, ukoliko se u sklopu PCR reakcije koja polazi od jedne molekule DNA provede n ciklusa, nastat će ukupno 2^n molekula DNA (slika 4) (Dale i sur., 2012.).



Slika 4. Umnažanje jedne molekule DNA lančanom reakcijom polimerazom i grafički prikaz odnosa broja ciklusa i broja nastalih kopija DNA

4.2. Usporedba RAPD i PCR

Iako je PCR osnova RAPD metode, uvjeti odvijanja reakcije nešto su drukčiji u metodi RAPD u odnosu na klasični PCR (tablica 1).

Za razliku od klasičnog PCR-a, u reakcijsku smjesu se umjesto dvije početnice može dodati samo jedna ili više njih. Za njihovu sintezu nije potrebno poznavanje slijeda nukleotida u dijelu

DNA koja služi kao kalup (Hadrys i sur., 1992). Početnica se, zahvaljujući prilagođenim uvjetima reakcije, veže na kalup i kada nisu u potpunosti komplementarni. Takvi uvjeti reakcije postižu se sniženjem temperature vezanja početnice na kalup, povećanjem koncentracije Mg^{2+} iona u reakcijskoj otopini ili korištenjem kraćih početnica. Do umnažanja neke nasumične DNA sekvence može doći samo ako se dvije početnice na nju vežu relativno blizu jedna drugoj i u pravilnoj orijentaciji (3' prema 3'). Konačno, kao rezultat RAPD-a neće nastati veći broj identičnih DNA odsječaka nego više različitih, ovisno o tome gdje su se i na koji način vezale korištene početnice (Atienzar i Jha, 2006; Hadrys i sur., 1992; Power, 1996).

PCR i RAPD ponajviše se razlikuju u uvjetima provođenja reakcije. PCR se inače odvija u 30 ciklusa, dakle 10-15 manje nego RAPD, te koraci početne denaturacije, denaturacije i vezanja početnica na kalup ne traju jednako dugo. Već je spomenuta i temperatura komplementarnog sparivanja početnica s kalupom koja u PCR-u iznosi oko 55 °C a u RAPD-u oko 36 °C (Sudan i sur., 2017). Uređaj u kojem se provodi reakcija, proces razdvajanja i vizualizacije umnoženih fragmenata isti su u ove dvije metode.

Tablica 1. Najčešće korišteni uvjeti provođenja RAPD i PCR

	RAPD	PCR
Početna denaturacija	94 °C; 300 s	94 °C; 60 s
Denaturacija	94 °C; 60 s	94 °C; 45 s
Vezanje početnica na kalup	36 °C; 45 s	55 °C; 60 s
Produljenje lanca	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Završna sinteza	72 °C; 300 s	72 °C; 300 s
Početnice	jedna ili više, duljine 8-20 pb	dvije, duljine 12-30 pb
Uvjeti	manje strogi (niža temperatura hibridizacije, veća koncentracija Mg^{2+} , kraće početnice)	strogi
Produkti	više različitih	više identičnih
Broj ciklusa	45	30

4.3. Usporedba RAPD s drugim metodama

Zahtjevi koje bi trebale ispunjavati metode korištene u analizi DNA jesu velika moć diskriminacije, reproducibilnost, stabilnost, jednostavnost, prihvatljiva cijena i brzina (Auda i sur., 2017). Metode koje se najčešće koriste u tu svrhu međusobno se razlikuju u složenosti, potrebnoj količini DNA i informacijama o analiziranom genomu, analitičkoj moći, skupoći i primjenjivosti (Hadrys i sur., 1992).

Identifikacija i razvrstavanje u različite taksonomske skupine kao osnovna primjena RAPD-a mogući su i primjenom drugih metoda analize DNA. Ponekad se u određivanju vrsta koriste i proteinski testovi. Međutim, njih karakterizira manjak pouzdanosti zbog zagrijavanja i kemijskih reakcija koje rezultiraju denaturacijom analiziranih proteina (Lin i sur., 2018). U dijagnostici, osim metoda temeljenih na PCR-u, moguće je koristiti i serološke testove (IFAT-indirect fluorescent antibody technique i ELISA-enzyme linked immunosorbent assay) koji se temelje na antigen-antitijelo interakcijama. Nedostatak ovih metoda jest mogućnost identifikacije tek nakon pojave antitijela, što može potrajati i nekoliko godina nakon oporavka od infekcije. Stoga se u dijagnostici najčešće koristi PCR i na njemu temeljene metode. Tu je velika prednost RAPD-a jednostavnost i brzina, za razliku od ostalih koje su relativno dugotrajne metode (Sudan i sur., 2017).

U području istraživanja genotoksičnosti i mutagenosti te u ekotoksikologiji, osim RAPD-a se koriste i citogenetički pristupi koji uključuju identifikaciju SCE (sister chromatid exchanges) i Cab (chromosomal aberrations) te različite kvantitativne metode. RAPD je jednake osjetljivosti kao test detekcije kromosomskih aberacija te veće osjetljivosti od testa detekcije izmjene sestrinskih kromatida. U slučaju kada mehanizam djelovanja potencijalnog genotoksina nije poznat, RAPD kao kvalitativna ili semikvantitativna metoda ima prednost pred kvantitativnim metodama. Zaključno, može se reći kako je RAPD dovoljno osjetljiva metoda za utvrđivanje djelovanja genotoksina i mutagena na DNA (Atienzar i Jha, 2006). Ponekad je, ipak, za potvrdu dobivenih rezultata i određivanje prirode uočenih promjena u molekuli DNA potrebno provesti dodatna istraživanja kloniranjem, sekvencioniranjem i korištenjem označenih proba (De Wolf i sur., 2004).

U toksikologiji i ekotoksikologiji važna je i analiza ekspresije gena, gdje se najviše koristi tehnika mikročipova. Međutim, RAPD metoda može služiti kao dopuna ili zamjena mikročipovima iz tri razloga: jeftinija je, ima mogućnost praćenja genetičkih promjena i u

nekodirajućim regijama DNA te pruža mogućnost simultane detekcije i kloniranja dijelova genoma što je s DNA mikročipovima teško postići (Atienzar i Jha, 2006).

Razlog zbog kojeg se RAPD puno češće koristi od njemu sličnih metoda (AP-PCR i DAF) je veća jednostavnost i mogućnost vizualizacije najvećeg raspona duljina umnoženih fragmenata (Atienzar i Jha, 2006).

4.4. Utjecaj ključnih parametara na RAPD analizu

Niz parametara može utjecati na rezultate RAPD analize. Ti se parametri mogu podijeliti u skupine uvjeta reakcije i sastojaka reakcijske otopine. Prikladnom optimizacijom metode moguće je znatno povećati njezinu reproducibilnost i ponovljivost te je stoga vrlo važno obratiti pažnju na ove parametre prilikom njezine primjene (Atienzar i Jha, 2006).

Kada su u pitanju uvjeti reakcije, misli se prvenstveno na temperaturu vezanja početnica na kalup. Ova temperatura, prema nekim autorima, ne bi trebala prelaziti 40 °C. Niske su temperature preporučljive zbog dobivanja optimalnog broja umnoženih fragmenata. S druge strane, one pogoduju odvijanju nespecifičnih reakcija. Stoga je potrebno pronaći kompromis između ova dva ishoda. Neki autori ističu kako se odvijanje nespecifičnih reakcija može učinkovito spriječiti namještanjem temperature hibridizacije na vrijednost oko 50 °C, bez narušavanja kvalitete dobivenih rezultata (Atienzar i Jha, 2006). Na temperaturu i njezin prijenos kroz reakcijsku smjesu mogu utjecati i parametri poput modela uređaja za PCR, načina kontrole temperature i debljine stijenke tubice za uzorak. Povećanje temperature iznad 65 °C pak sprječava vezanje početnica na kalup i umnažanje fragmenata. Eksperimentima je pokazano kako broj ciklusa obično ne utječe na rezultate, iako je pri broju ciklusa manjem od 30 uočen nedostatak pojedinih vrpca (Power, 1996).

Najutjecajnijim parametrom u RAPD analizi smatra se odabir početnica. Pritom treba obratiti pažnju na njihovu duljinu, koncentraciju i redoslijed nukleotida. Redoslijed nukleotida unutar početnica ne utječe značajno na analizu pri niskim temperaturama hibridizacije. Međutim, teško je predvidjeti na kojim će se mjestima i koliko često korištena početnica vezati na kalup te je stoga potrebno provesti reakciju s više početnica ili kombinacija početnica i izabrati one koje daju optimalan broj umnoženih fragmenata. Ova se provjera može provesti i *in silico*, no često se tako dobiveni podatci ne slažu sa stvarnim, eksperimentalno dobivenim (Mathis i sur., 2011; Power, 1996). Duljina početnica ovisi o samom kalupu te najčešće iznosi 10 nukleotida. Neki autori smatraju kako dulje početnice imaju veću moć diskriminacije, međutim to se ne može sa sigurnošću tvrditi za svaki genom koji se analizira te je odgovarajuću početnicu

potrebno pronaći za svaki posebno. Koncentracija početnica trebala bi biti takva da daje veći broj manjih fragmenata, a da su oni i dalje jasno vidljivi u gelu. Neki autori smatraju važnim i GC sastav korištenih početnica koji bi, radi povećanja broja mjesta vezanja početnica na kalup i samim time broja umnoženih fragmenata, trebao biti sličan GC sastavu kalupa. U nekim slučajevima se pak pokazalo kako su GC bogate početnice jednako uspješne i u umnažanju AT bogatih genoma (Rawadi, 1998). Najčešće se koriste početnice sa 40-70 % G i C baza, a veći udio tih baza povećava uspješnost vezanja početnica pri manje strogim uvjetima reakcije (Hadrys i sur., 1992; Tofalo i Corsetti, 2017).

Od drugih sastojaka reakcijske smjese (kalup DNA, enzim, deoksiribonukleotidi), potrebno je obratiti pažnju na čistoću i koncentraciju kalupa DNA, vrstu i koncentraciju DNA polimeraze i koncentraciju dNTP-ova. Utvrđeno je kako kalup DNA može biti uspješno pročišćen metodom pomoću fenola i kloroforma. Pritom se uklanjaju makromolekule i inhibitori koji bi inače utjecali na uspješnost vezanja početnica na DNA. Koncentracija DNA treba osigurati reproducibilne rezultate s optimalnim brojem umnoženih fragmenata i maksimalnu diskriminaciju (Atienzar i Jha, 2006). Zanimljiva je pojava manje vrpce pri korištenju veće koncentracije DNA, fenomen koji se pojavljuje zbog manjka početnica u odnosu na kalup što za posljedicu ima smanjenje broja mjesta njihova vezanja (Power, 1996). Optimalna koncentracija kalupa DNA obično se mijenja ovisno o korištenoj kombinaciji kalup-početnica (Hadrys i sur., 1992). Kod odabira enzima važno je obratiti pažnju na karakteristike poput procesivnosti i 3'-5' egzonukleazne aktivnosti. Procesivnost enzima utječe na količinu sintetiziranih produkata različitih veličina. 3'-5' egzonukleazna aktivnost prepoznaje pogrešno sparenu bazu na 3' kraju prilikom povezivanja početnice i kalupa i omogućuje nastavak polimerizacije istovremeno povećavajući broj mjesta vezanja početnica na kalup koja će zaista i dati produkte (Power, 1996). Prilagodbom koncentracije dNTP-ova može se znatno umanjiti učestalost pojave umnoženih fragmenata u negativnim kontrolama (uzorcima bez kalupa DNA).

4.5. Prednosti i nedostatci metode RAPD

Najvećom prednošću metode svakako se smatra nepostojanje potrebe za poznavanjem genoma koji se analizira. Također, polazi od njegove vrlo male količine i može se provesti nedestruktivno, što je korisno u analizi rijetkih i vrijednih uzoraka. Korištenje većeg broja različitih početnica pruža mogućnost dobivanja više različitih uzoraka umnoženih fragmenata DNA koji se međusobno razlikuju u složenosti. Metoda je osjetljiva, jeftina, ne zahtijeva korištenje skupe i visokospecijalizirane opreme i teorijski je primjenjiva na bilo koji organizam (Atienzar i Jha, 2006; Power, 1996). Nakon optimizacije i standardizacije, postaje pouzdana uz dobru ponovljivost rezultata. To podrazumijeva standardizaciju metode pripreme DNA,

volumena i koncentracija reagenasa, procesa vizualizacije umnoženih fragmenata i korištenje istih uređaja i enzima. Na području ispitivanja genotoksičnosti i karcinogeneze, ima mogućnost pronalaska širokog spektra oštećenja i mutacija u DNA te omogućuje istodobnu detekciju i kloniranje izmjena u genomu bez poznavanja izmijenjene regije (Atienzar i Jha, 1996). Brzina metode u utvrđivanju roditeljstva osobito se očituje u odnosu na druge metode zbog mogućnosti istodobne analize velikog broja potomaka (Hadrys i sur., 1992).

S druge strane, metodu karakteriziraju i određeni nedostaci. To je, prije svega, manjak reproducibilnosti zbog velike osjetljivosti metode na uvjete reakcije, koja se ponekad ne može nadomjestiti niti standardizacijom zbog razlika u samoj provedbi metode koja se razlikuje od laboratorija do laboratorija. Moguće je rješenje jedino automatizacija sustava za pripremu DNA i stvaranje zajedničkog protokola koji će se koristiti u izradi i interpretaciji RAPD profila (Hadrys i sur., 1992; Power, 1996). Nadalje, problem predstavlja pojava produkata koji nisu rezultat umnažanja kalupa, osobito u uzorcima koji ne sadrže kalup DNA (negativna kontrola). Ti se produkti u uzorcima koji sadrže DNA mogu identificirati provedbom reakcije s dvije koncentracije DNA koje se međusobno razlikuju barem dva puta, a na ovaj se način može poboljšati i reproducibilnost metode (Atienzar i Jha, 1996). Vezanjem početnica na kalup pri nižim temperaturama mogu nastati nespecifični produkti. Metode kojima je moguće smanjiti učestalost njihova nastajanja jesu tzv. hot-start tehnike i metode s antitijelima. Hot-start tehnike podrazumijevaju upotrebu hot-start polimeraza koje se aktiviraju tek nakon prvog zagrijavanja reakcijske otopine na 95 °C. Time se izbjegava sinteza fragmenata prilikom vezanja početnica na kalup pri nižim temperaturama, pri kojima enzim još uvijek nije aktivan i ne može provoditi sintezu (Power, 1996). Po pitanju početnica postoje i poteškoće u izboru njihove odgovarajuće duljine. Prekratke početnice mogu umnožiti nepotrebno veliki broj fragmenata i otežati vizualizaciju, dok preduge početnice ponekad umnažaju premalo fragmenata i daju neinformativne rezultate (Hadrys i sur., 1992). Upitna je i prikladnost metode u ispitivanju roditeljstva zbog pojave neparentalnih vrpca u uzorcima potomstva poznatog podrijetla. Takve se vrpce, koje pokazuju lažne polimorfizme, mogu pojaviti uslijed tvorbe heterodupleksa međusobnim povezivanjem RAPD produkata. Stvaranju heterodupleksa pogoduje smanjena uspješnost denaturacije DNA u kasnijim koracima umnažanja, a samim time i uspješnost vezanja početnica na kalup (Power, 1996). Veliki je izazov kod RAPD metode točno utvrđivanje razloga zbog kojih je došlo do izmjena u dobivenim uzorcima umnoženih fragmenata. Dakle, dodatni je nedostatak nemogućnost određivanja prirode promjene koja se dogodila u DNA i uzrokovala promjenu rezultata. Pored toga, RAPD je kvalitativna ili semikvantitativna metoda te se stoga ne može koristiti u kvantifikaciji uočenih promjena

(Atienzar i Jha, 2006). S druge strane, gel elektroforeza koja se koristi u sklopu metode omogućuje kvantitativno (prema veličini) ali ne i kvalitativno (prema redoslijedu nukleotida) razdvajanje fragmenata (Kumari i Thakur, 2014). Kada je u pitanju korištenje RAPD-a u usporedne svrhe, može se provoditi samo pod pretpostavkom da su uočeni fragmenti jednake veličine homologni (Atienzar i Jha, 2006). To nije uvijek slučaj budući da zbog pojave komigracije fragmenti koji ne potječu s istog mjesta u genomu imaju prividno jednake veličine. Tada je potrebno provjeriti homolognost naizgled jednakih fragmenata metodama poput sekvencioniranja ili provedbom elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (Hadrys i sur., 1992). Problem se može pojaviti i prilikom korištenja samo jedne početnice. Naime, fragmenti dobiveni takvim umnažanjem imaju tzv. palindromske sekvence na svojim krajevima. One mogu uzrokovati stvaranje sekundarnih struktura ukosnica koje ometaju vezanje početnice na kalup u sljedećim koracima umnažanja. Međutim, ovaj se problem može lako riješiti korištenjem dviju ili više početnica u RAPD analizi. Problemi se mogu pojaviti i prilikom vizualizacije umnoženih fragmenata u gelu. Samom postupku vizualizacije pod UV svjetlom prethodi korak uklanjanja viška boje s gela radi pružanja mogućnosti nesmetane vizualizacije vrpce. Duljina postupka uklanjanja boje kao i način na koji se on provodi mogu utjecati na nestajanje vrpce koje su prije tog postupka bile vidljive u gelu. Osim toga, tu je i subjektivnost te dvosmislenost interpretacije dobivenih profila. Ona se dijelom može riješiti korištenjem računala (Power, 1996; Kumari i Thakur, 2014). RAPD markeri, u usporedbi s drugim molekularnim markerima, pružaju najmanje informacija o analiziranom genomu te zbog njihove dominantnosti nije moguće zaključiti potječe li umnoženi fragment s homozigotnog ili heterozigotnog lokusa (Hadrys i sur., 1992; Tofalo i Corsetti, 2017). Budući da RAPD početnice obično sadrže visoki udio G i C baza, ponekad imaju veću uspješnost u umnažanju GC bogatih regija koje nisu ravnomjerno raspoređene u genomu (De Wolf i sur., 2004). Zbog korištenja početnica koje pokrivaju ograničeni dio genoma ponekad se u analizi mogu propustiti njegovi ključni segmenti (Lin i sur., 2018). Konačno, osim DNA prisutne u jezgri, zbog nasumične prirode umnažanja može doći i do umnažanja DNA prisutne u drugim organelama, što dodatno otežava ionako složenu interpretaciju RAPD profila (De Wolf i sur., 2004; Tofalo i Corsetti, 2017). Osnovne prednosti i nedostaci metode prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Prednosti i nedostatci metode RAPD

PREDNOSTI	NEDOSTATCI
mogućnost analize nepoznatog genoma	manjak pouzdanosti, reproducibilnosti i ponovljivosti (potreba za standardizacijom i optimizacijom)
nedestruktivna i osjetljiva	pojava produkata koji nisu rezultat umnažanja kalupa
jeftina i brza	složenost i subjektivnost u interpretaciji RAPD profila
mogućnost istodobne analize velikog broja uzoraka	nemogućnost određivanja prirode uočene promjene u DNA
nema potrebe za korištenjem skupe i visokospecijalizirane opreme	nemogućnost kvantifikacije uočenih promjena
mogućnost analize s više različitih početnica	komigracija nehomolognih fragmenata
zahtijeva malu količinu DNA	dominantnost RAPD markera
primjenjiva na svaki organizam	propuštanje bitnih odsječaka genoma

4.6. Analiza i prikaz rezultata

Kao rezultat slučajnog umnažanja polimorfne DNA nastaje veći broj umnoženih fragmenata DNA. Ti se fragmenti kao dio reakcijske smjese nanose na gel za elektroforezu i u njemu vizualiziraju.

Analiza dobivenih podataka provodi se pomoću različitih statističkih i numeričkih metoda, najčešće primjenom za to predviđenih računalnih programa. Analiza dobivenih klastera se, primjerice, može provesti UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) metodom uz izračun sličnosti dobivenih profila pomoću Pearsonovog koeficijenta sličnosti (Tofalo i Corsetti, 2017.). Kako bi se u potpunosti iskoristio potencijal koji pruža RAPD i povećala njegova pouzdanost, poželjno je u svim provedenim istraživanjima koristiti numeričke i statističke parametre i alate.

4.6.1. Gel elektroforeza

Elektroforeza je postupak koji se temelji na gibanju nabijenih molekula kroz čvrsti nosač (agarozni ili poliakrilamidni gel) u električnom polju. Zbog negativnog naboja nukleinskih kiselina koji potječe od fosfatnih skupina u njihovoj okosnici, one se u električnom polju kreću od negativnog ka pozitivnom polu. Pritom brzina njihova kretanja ovisi o više faktora, kao što su: veličina molekula, njihova konformacija, primijenjeni napon i gustoća nosača. S druge strane, kreću se neovisno o naboju, budući da je broj fosfatnih skupina koje sadrže proporcionalan duljini lanca. Općenito vrijedi da se dulje molekule kreću sporije od kraćih. Osim veličine, važnu ulogu ima i konformacija molekula te gustoća gela (Dale i sur., 2012)

Analitička gel elektroforeza vrlo se često, pa tako i u RAPD-u, koristi za određivanje duljine fragmenata DNA. S druge strane, preparativna gel elektroforeza koristi se u svrhu pročišćavanja molekula koje će se dalje koristiti (Dale i sur., 2012).

S ciljem vizualizacije razdvojenih fragmenata, isti se bojaju u otopini etidij bromida nakon čega se gel promatra pod UV svjetlom (Tofalo i Corsetti, 2017). Moguće je i korištenje boja vidljivih pod prirodnim svjetlom, primjerice kristal violet, koje su manje osjetljive u odnosu na etidij bromid (Dale i sur., 2012).

4.6.2. Interpretacija rezultata RAPD analize

Uzorci fragmenata umnoženih RAPD metodom razlikuju se između pojedinih organizama. Razlike se vide u obliku prisutnosti ili odsutnosti specifičnih vrpca u gelu, a ovise o prisutnosti mjesta vezanja početnica, njihovoj udaljenosti i uspješnosti sparivanja početnica i kalupa, osobito na 3' kraju (De Wolf i sur., 2004).

Do gubitka starih ili pojave novih vrpca može doći zbog točkastih mutacija, inverzija, delecija, adicija ili većih izmjena u kromosomima na mjestima vezanja početnica. Neka od navedenih promjena u genomu može povećati i udaljenost između dvaju mjesta vezanja početnica zbog čega umnažanje fragmenta između njih više nije moguće (De Wolf i sur., 2004). Mutacije često mogu nastati i unutar samog fragmenta koji se umnaža, što se također vidi kao razlika u RAPD profilima, osobito ako se radi o većim mutacijama (Atienzar i Jha, 2006).

Puno veći utjecaj na RAPD profile u odnosu na točkaste mutacije imaju oštećenja u DNA koja blokiraju rad enzima. Takav utjecaj mogu imati i točkaste mutacije, ukoliko uzrokuju strukturne promjene unutar fragmenata koji se umnažaju. Enzim, ukoliko se nađe na mjestu na kojem je došlo do ovakvih promjena, može stati s polimerizacijom, odnosno disocirati s kalupa (tada ne

dolazi do umnažanja) ili nastaviti sintezu. Ako enzim nastavi sintezu, njegova procesivnost može biti narušena i intenzitet vrpce smanjen, ili pak do narušavanja procesivnosti enzima ne dolazi pa se niti intenzitet vrpce ne mijenja (Atienzar i Jha, 2006).

Na promjenu u RAPD profilima dodatno mogu utjecati i promjene broja kopija gena, metilacija DNA, stabilne sekundarne strukture unutar DNA koje otežavaju denaturaciju itd. Dobro je naglasiti kako, zbog odnosa u veličini, sve navedene promjene češće nastaju unutar fragmenata koji se umnažaju nego unutar mjesta vezanja početnica. Budući da se promjena vrpce može zapaziti samo ako je nastala uslijed promjene koja se dogodila u barem 2 % DNA, mutacije koje se događaju na mjestima vezanja početnica obično se ne vide kao polimorfizmi (Atienzar i Jha, 2006).

Osim u prisutnosti i odsutnosti vrpce, promjene se uočavaju i u njihovom intenzitetu. Do njih najčešće dolazi zbog promjene broja kopija fragmenata i djelomičnog sparivanja početnica i kalupa (De Wolf i sur., 2004). Naime, do nepravilnog sparivanja početnice i kalupa može doći na 5' kraju početnice, njezinom 3' kraju i u središtu. Samo u slučaju nepravilnog sparivanja na 3' kraju neće doći do umnažanja fragmenta, dok nepotpuno sparivanje na 5' kraju ili u središtu početnice može rezultirati promjenom intenziteta vrpce koja predstavlja promatrani fragment (Power, 1996).

4.7. Uređaji i materijali

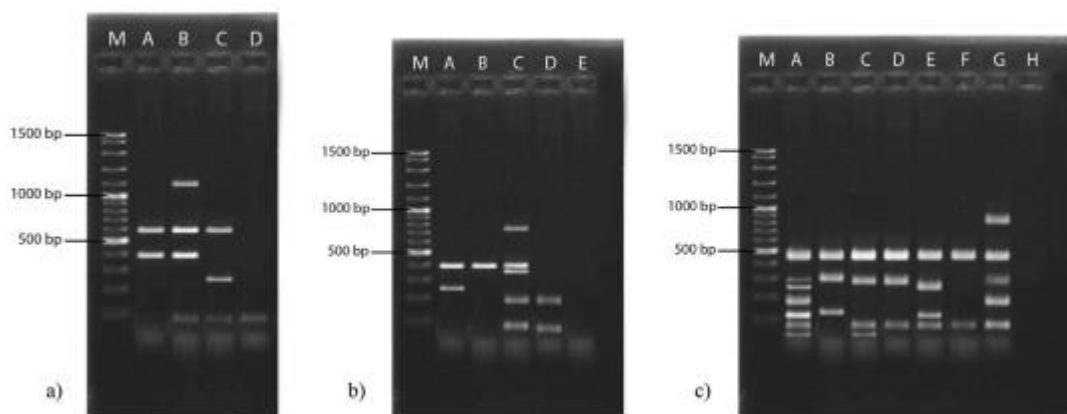
Uređaji koji se koriste u sklopu RAPD analize jesu uređaj za PCR (Thermocycler), uređaj za elektroforezu, centrifuga (koristi se kod izolacije DNA), spektrofotometar (za određivanje koncentracije DNA) i UV transiluminator (Tofalo i Corsetti, 2017). Thermocycler je programabilni uređaj u kojemu se na temelju sustava hlađenja i grijanja postiže zadana temperatura metalnog bloka u koji se umeće tubica s uzorkom. Tubica je tankih stijenki, što omogućuje brzu i ravnomjernu promjenu temperature uzorka (Dale i sur., 2012).

Materijali nužni za odvijanje cijelog postupka uključuju stanice organizma čija se genomska analiza provodi i pogodnu podlogu za njihov uzgoj, komercijalne setove za izolaciju i kemikalije za pročišćavanje DNA iz uzgojenih stanica, termostabilnu DNA polimerazu, početnice, otopinu $MgCl_2$, otopinu dNTP, agarozu, etidij bromid, DNA koja će poslužiti kao standard za određivanje veličine umnoženih fragmenata i potrebne pufere (Tofalo i Corsetti, 2017).

5. Primjena metode

RAPD se koristi u mikrobiologiji, veterini, medicini, prehrambenoj tehnologiji, agrikulturi, biotehnologiji i drugim područjima.

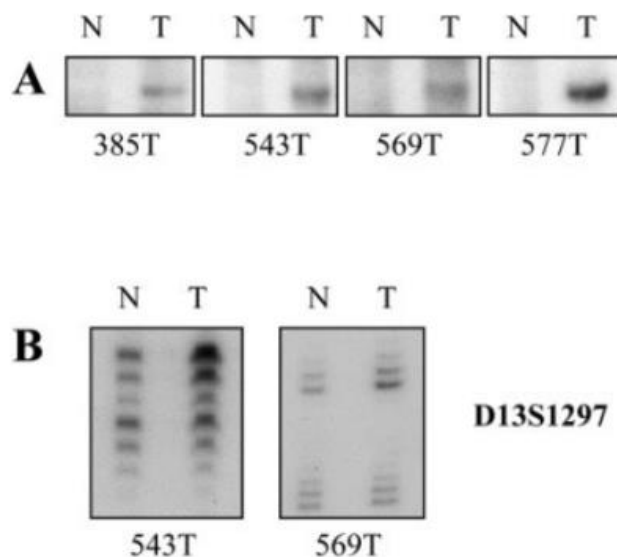
Identifikacija i razvrstavanje mikroorganizama u određene skupine prema karakteristikama koje ih međusobno povezuju ima veliku važnost budući da su mikroorganizmi izvor mnogobrojnih pojava u okolišu i živom svijetu. Oni, primjerice, uzrokuju epidemije, infekcije i intoksikacije, različita patološka stanja, kvarenje namirnica i slično (Power, 1996). *Staphylococcus aureus* je oportunistička bakterija koja prirodno obitava u probavnom traktu ljudi i životinja. Najveći doprinos njenoj patogenosti daju enterotoksini, metaboliti visoke otpornosti koji kontaminiranom hranom mogu dospjeti u organizam čovjeka i uzrokovati intoksikacije (Sandel i McKillip, 2004). Jedan od nedavno objavljenih radova usredotočen je upravo na ovu bakteriju i opisuje analizu 50 izolata podrijetlom iz hrane, zaraženih pacijenata, mlijeka zaraženih goveda i novčanica. Analiza je provedena pomoću tri različite početnice koje su se pokazale uspješnima u identifikaciji izolata. Također, rezultati podupiru otprije poznatu činjenicu da je *Staphylococcus aureus* visokovarijabilna bakterijska vrsta i da postoje razlike u genomu izolata prikupljenih iz različitih izvora koje se mogu uspješno uočiti primjenom metode RAPD (slika 5) (Zare i sur., 2019).



Slika 5. Rezultati RAPD analize izolata *S. aureus* prikupljenih iz različitih izvora (Zare i sur., 2019). Prikazani uzorci dobiveni su pomoću početnica: a) OLP6 (5'-GAGGGAAGAG-3'), b) OLP11 (5'-ACGATGAGCC-3') i c) OLP13 (5'-ACCGCCTGCT-3'). U jažici M nalazi se standard za elektroforezu. U jažicama A-H nalaze se umnoženi fragmenti DNA dobiveni RAPD analizom sojeva *S. aureus* izoliranih iz hrane, pacijenata, govedeg mlijeka i novčanica.

Primjena metode RAPD u veterini i medicini često je usko povezana s njenom primjenom u mikrobiologiji te služi za detekciju mikroorganizama uzročnika bolesti kod ljudi i životinja.

Na području medicine RAPD se pokazao kao metoda velikog potencijala u istraživanju karcinogeneze, odnosno razvoja raka. Metoda pruža mogućnost uočavanja događaja koji se odvijaju na razini DNA pri transformaciji normalne u stanicu raka i utvrđivanja povezanosti između kliničko-patoloških parametara tumora i stope smrtnosti pacijenata. Naime, stanice raka pokazuju veliku genetičku nestabilnost, osobito po pitanju promjene broja kopija gena, te se izolacijom DNA iz zdravih i tumorskih stanica istog pacijenta i njihovom analizom pomoću RAPD-a može utvrditi gubitak stare ili pojava nove kopije nekog gena (Atienzar i Jha, 2006). Na ovom principu zasnovana su i izvedena brojna istraživanja. Ong i sur. (1998) ispitali su uspješnost metode u detekciji genetičke nestabilnosti stanica raka iz plućnog tkiva. Izolirane su stanice raka i normalne stanice iz pluća 20 pacijenata i umnožene pomoću sedam različitih početnica duljine deset nukleotida. Promjene u DNA uočene su u čak 19 od ukupno 20 uzoraka. Jednako uspješnom metoda se pokazala u analizi DNA stanica raka usne šupljine. Naime, pomoću nje uočen je gen čija izmjena i prekomjerna ekspresija potpomaže razvoj raka u usnoj šupljini. Izolirana je DNA iz stanica raka i normalnih stanica usne šupljine 20 pacijenata, a usporedbom dobivenih uzoraka utvrđena je pojava nove vrpce (slika 6). Kasnijim istraživanjima utvrđeno je da se izmjena uočenog gena često pojavljuje u različitim tipovima raka zbog uloge njegovog produkta, proteina AKAP220, u regulaciji staničnog ciklusa (Garnis i sur., 2005).



Slika 6. Rezultati RAPD analize normalnih stanica i stanica raka usne šupljine (Garnis i sur., 2005). N-normalne stanice; T-tumorske stanice. Na slici a) vidljiva je pojava nove vrpce (400 pb) kod četiri od ukupno 20 ispitanika (385T, 543T, 569T i 577T). Naknadnom analizom utvrđeno je mjesto na kromosomu na kojem se dogodila promjena i uočeni RAPD marker nazvan je D13S1297. Na slici b) prikazana je analiza AI (allelic imbalance) tog markera kod ispitanika 543T i 569T kojom je utvrđena pojačana ekspresija u gornjem dijelu alela.

Osim u detekciji promjena koje se događaju u stanicama tijekom procesa karcinogeneze, RAPD se koristi i u analizi kancerogenog djelovanja različitih agenasa. Jedno od takvih istraživanja

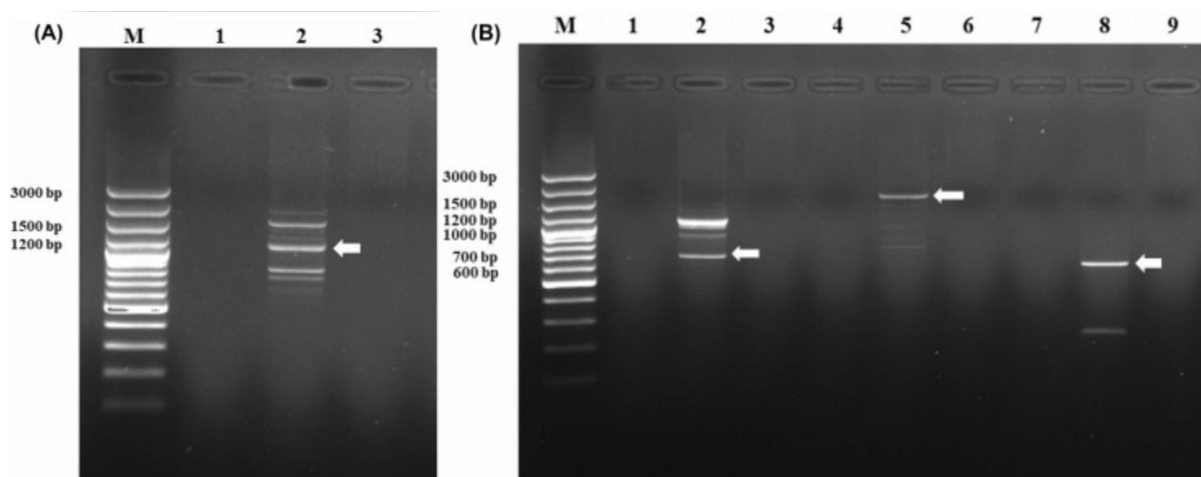
provedeno je za berilij i njegove spojeve zbog izloženosti velikog broja radnika u proizvodnim pogonima istim. U tu su svrhu stanice sisavaca tretirane spojevima berilija koji su potencijalni kancerogeni, a kasnijom je usporedbom s netretiranim stanicama pomoću RAPD-a analizirana njihova genetička nestabilnost. Utvrđena je genetička nestabilnost stanica tretiranih s 5 od 10 ispitanih spojeva (Keshava i sur., 2001).

RAPD se pokazao i kao moćan pristup u molekularnoj ekologiji, gdje se koristi za svrstavanje pojedinaca u odgovarajuće taksonomske skupine, procjenu rodničkih odnosa i ispitivanje roditeljstva u jednostavnim uzorcima monogamnih i uzorcima izmiješanih genoma poligamnih sustava, detekciju protoka gena i formiranja hibrida. Podjela pojedinaca u taksonomske skupine temelji se na njihovim zajedničkim karakteristikama i karakteristikama koje ih međusobno razlikuju. Primjenom RAPD-a umnoženi se fragmenti pojedinaca međusobno uspoređuju i utvrđuje se prisutnost monomorfničkih (konstantničkih) i polimorfničkih (varijabilničkih) karakteristika. Primjerice, svrstavanje jedinki u istu vrstu podrazumijeva postojanje karakteristike (dijagnostičkog markera) koja je zajednička za njih, a istovremeno ih razlikuje od pripadnika drugih vrsta. Na isti način se, na temelju postojanja dijagnostičkog markera karakterističnog za rod, više vrsta može svrstati u isti rod. Prema tom se principu može vršiti i razvrstavanje u više taksonomske skupine, često uz dodatna ispitivanja drugim molekularnim tehnikama zbog isključivanja mogućnosti komigracije fragmenata jednake veličine iz nehomolognih lokusa (Hadrys i sur., 1992).

Dodatni potencijal RAPD-a vezan je uz identifikaciju gena odgovornih za poželjna svojstva važnih poljoprivrednih i stočarskih proizvoda. Primjer je gen koji omogućuje opstanak jagode, njezinu proizvodnju i prodaju u većem dijelu godine. Sugimoto i sur. (2005) su pomoću metode RAPD identificirali markere povezane s ovim genom u dvama kultivarima jagode i potomstvu dobivenom njihovim križanjem.

Veliki problem u prehrambenoj industriji predstavlja krivotvorenje prehrambenih proizvoda. Njegovo rješavanje moguće je primjenom različitih proteinskih i DNA testova u određivanju autentičnosti proizvoda poput kave, meda, mljevenog mesa itd. Navedeni je problem vrlo izražen u industriji mesa, gdje proizvođači miješaju ili potpuno mijenjaju meso visoke kvalitete onim niskokvalitetnim te ga prodaju kao visokokvalitetni mesni proizvod s ciljem većeg novčanog dobitka. Stoga ne čudi potreba za metodom koja će pružiti mogućnost pouzdanog praćenja podrijetla mesa, određivanja njegove vrste, čistoće i autentičnosti. Potencijal RAPD-a u ovom području ispitan je kod identifikacije triju podvrsta govedine. U tu su svrhu korištene četiri početnice duljine deset nukleotida. Uspoređeni su uzorci dobiveni za tri vrste govedine,

a ovisno o korištenoj početnici, mijenjao se broj zajedničkih vrpca i vrpca specifičnih za pojedine vrste govedine. Analizom je utvrđena uspješnost RAPD metode u identifikaciji ovih vrsta mesa, kao i potencijal za širu primjenu u mesnoj industriji (slika 7) (Lin i sur., 2018).



Slika 7. Rezultati RAPD analize triju podvrsta govedine dobiveni umnažanjem pomoću početnica OPK07, OPK12, OPK14 i OPK19 (Lin i sur., 2018). Slovom M označena je jažica u kojoj se nalazi standard za gel elektroforezu. a) Karakteristične vrpce podvrste Angus uočene umnažanjem pomoću početnice OPK07. U jažici 1 nalazi se uzorak DNA podvrste Holstein, u jažici 2 uzorak DNA podvrste Angus s naznačenom jedinstvenom vrpcom veličine 1200 pb, a u jažici 3 uzorak DNA podvrste Taiwan Yellow Cattle. b) U jažicama 1, 4 i 7 nalazi se uzorak DNA podvrste Holstein, u jažicama 2, 5 i 8 uzorak DNA podvrste Angus, a u jažicama 3, 6 i 9 uzorak DNA podvrste Taiwan Yellow Cattle. Za umnažanje DNA korištene su tri početnice: OPK12 (5'-TGGCCCTCAC-3'), OPK14 (5'-CCCGCTACAC-3') i OPK19 (5'-CACAGGCGGA-3'). U sva tri slučaja uočene su jedinstvene vrpce za podvrstu Angus. Vrpce veličina 700 pb, 1800 pb i 600 pb naznačene su strelicama.

Primjena metode RAPD moguća je i u biotehnologiji. Ona se može povezati s već spomenutom primjenom u agrikulturi, kojom se bavi zelena biotehnologija. Grane biotehnologije u kojima bi se mogla primijeniti ova metoda jesu i bijela (industrijska) biotehnologija koja koristi mikroorganizme u proizvodnji širokog spektra proizvoda te crvena (medicinska) biotehnologija, osobito područje dijagnostike, što je također prethodno opisano.

Analize genoma i genetičke varijabilnosti proizvodnih mikroorganizama su česte i poželjne, bilo da se radi o mikroorganizmima iz prirode ili onim genetički modificiranim. Primjer analize jednog takvog mikroorganizma jest istraživanje provedeno sa sedam sojeva halofilne zelene mikroalge *Dunaliella salina*, važnog proizvođača β -karotena, koji imaju potencijal primjene u industriji. Analiza genoma ovih sojeva, izoliranih iz različitih područja više zemalja, provedena je pomoću RAPD i ITS markera, koji su dali jednako dobre rezultate i pokazali se pouzdanim alatom u ovakvim istraživanjima (Gómez i González, 2004).

6. Zaključci

1. Obzirom na jednostavnost, cijenu i vrijeme potrebno za provođenje analize, RAPD je metoda izbora za preliminarno određivanje srodnosti i postojanje polimorfizama u genomu istraživanih organizama.
2. Za razliku od metode PCR, RAPD se osniva na manje specifičnom sparivanju početnica i kalupa, odnosno kao klice za sintezu DNA mogu poslužiti i oligonukleotidi koji nisu potpuno komplementarni s kalupom pa relativno male promjene uvjeta mogu imati značajan utjecaj na reproducibilnost metode.
3. Da bi se maksimizirale prednosti i minimizirale mane metode RAPD, uvjete reakcije je potrebno detaljno optimizirati, a postupak provođenja strogo standardizirati.

7. Popis literature

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. i sur. (2002) *Biology of the Cell*, 4. izd., New York: Garland Science. 4. pogl.

Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Al Farhan, A.H., Al Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., Al Sadoon, M., Shobrak, M. (2010) A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *International Journal of Molecular Sciences* 11(5) str. 2079-2096

Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H. (2000) Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic Toxicology*, 1. i 2. izd., Elsevier. str. 1-12

Atienzar, F.A., Jha, A.N (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research* 613 str. 76-102

Auda, I.G., Al Kadmy, I.M.S., Kareem, S.M., Lafta, A.K., A'Affus, M.H.O., Khit, I.A.A. (2017) RAPD- and ERIC-Based Typing of Clinical and Enviromental *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Journal of AOAC International* 100 str. 533-536

Biocompare (1999) The Buyer's Guide for Life Scientists. <<https://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/7228-Thermostable-Polymerases/>> Pristupljeno 2. travnja 2020.

Dale, J.W., von Schantz, M., Plant, N. (2012) *From Genes to Genomes*, 3. izd., Wiley-Blackwell. str. 4-11; 33-36; 109-130; 275-282

De Wolf, H., Blust, R., Backeljau, T. (2004) The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research* 566 str. 249-262

Garnis, C., Rosin, M.P., Zhang, L., Lam, W.L. (2005) Alteration of AKAP220, an upstream component of the Rb pathway, in oral carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 116, 5. izd. str. 813-819

Gómez, P.I., González, M.A. (2004) Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. *Aquaculture*, 1.-4. izd., Elsevier. str. 149-162

Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1. izd., str. 55-63

Keshava, N., Zhou, G., Spruill, M., Ensell, M., Ong, T. (2001) Carcinogenic potential and genomic instability of beryllium sulphate in BALB/c-3T3 cells. *Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenesis. Developments in Molecular and Cellular Biochemistry* 34, Springer. str. 69-76

Kumari, N., Thakur, S.K. (2014) Randomly amplified polymorphic DNA-A brief review. *American Journal of Animal and Veterinary sciences* 9 (1) str. 6-13

Lin, C.C., Tang, P.C., Chiang, H.I. (2018) Development of RAPD-PCR assay for identifying Holstein, Angus, and Taiwan Yellow Cattle for meat adulteration detection. *Food Sci Biotechnol*, Springer

Mathis, D.L., Berghaus, R.D., Lee, M.D., Maurer, J.J. (2011) Variation in *Salmonella enteritidis* RAPD-PCR Patterns May Not Be Due to Genetic Differences. *Avian diseases* 55(4) str. 620-625

Mrežni udžbenik iz genetike, prof.dr.sc. Mirjana Pavlica, PMF
<<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl11.html>> Pristupljeno 14. svibnja 2020.

Next Day Science (2005) Advancing Today's Research. <<https://www.nextdayscience.com/tc-32-mini-thermal-cycler.htm>> Pristupljeno 9. srpnja 2020.

Ong, T.M., Song, B., Qian, H.W., Wu, Z.L., Whong, W.Z. (1998) Detection of genomic instability in lung cancer tissues by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis*, 1. izd., str. 233-235

Power, E.G.M. (1996) RAPD typing in microbiology-a technical review. *Journal of Hospital Infection* 34 str. 247-265

Rawadi, G.A. (1998) Characterization of Mycoplasmas by RAPD Fingerprinting. *Methods in Molecular Biology* 104 str. 180-187

Rettner, R. (2017) DNA: Definition, Structure & Discovery.
<<https://www.livescience.com/37247-dna.html>> Pristupljeno 30. ožujka 2020.

Sandel, M.K., McKillip, J.L. (2004) Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*, 1. izd., Elsevier str. 5-10

Sudan, V., Shanker, D., Jaiswal, A., Singh, A., Pandey, V. (2017) Standardization and validation of simple PCR, duplex PCR and RAPD in comparison to blood smear examination for diagnosing bovine tropical theileriosis. *Biologicals*, Elsevier. str. 1-4

Sugimoto, T., Tamaki, K., Matsumoto, J., Yamamoto, Y., Shiwaku, K., Watanabe, K. (2005) Detection of RAPD markers linked to the everbearing gene in Japanese cultivated strawberry. *Plant Breeding*, 5. izd., Wiley. str. 498-501

Teama, S. (2018) DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. str. 26-35

Tofalo, R., Corsetti, A. (2017) RAPD-PCR as a Rapid Approach for the Evaluation of Genotoxin-Induced Damage to Bacterial DNA. *Methods in Molecular Biology* 1644 str. 195-201

Zare, S., Derakhshandeh, A., Haghkhah, M., Naziri, Z., Broujeni, A.M. (2019) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* from different sources by RAPD-PCR analysis. *Heliyon* 5, Elsevier. str. 1-6

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Paola Laidan

ime i prezime studenta