

Metoda RAPD i njena primjena u istraživanju genotoksičnosti i karcinogeneze

Ćosić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:269980>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Metoda RAPD i njena primjena u istraživanju genotoksičnosti i karcinogeneze

The RAPD method and its application in studies of genotoxicity and
carcinogenesis

SEMINARSKI RAD

Marija Čosi

Preddiplomski studij molekularne biologije

Mentor: Prof.dr.sc. Mirjana Pavlica

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

UVOD	1
1. SVOJSTVA METODE RAPD.....	<u>2</u>
1.1. Princip rada metode.....	<u>2</u>
1.2. Ograni enja metode.....	<u>5</u>
2. OPTIMIZACIJA	<u>5</u>
2.1. Ponovljivost RAPD profila	<u>5</u>
2.2. Utjecaj temperature vezanja po etnica.....	<u>6</u>
2.3. Utjecaj PCR komponenti.....	<u>7</u>
3. PRIMJENA METODE RAPD	<u>9</u>
3.1. Istraživanje genotoksi nosti	<u>9</u>
3.2. Istraživanje promjene geneti ke strukture populacija	<u>12</u>
3.3. Istraživanje karcinogeneze	<u>13</u>
4. USPOREDBA S OSTALIM METODAMA.....	<u>15</u>
5. SAŽETAK.....	<u>16</u>
6. SUMMARY	<u>17</u>
7. LITERATURA.....	<u>18</u>

UVOD

Brzim razvojem tehnologije i industrije te ljudskom aktivnošću i nepažnjom mnogo štetnih tvari svakodnevno ulazi u ekosustav. Mnoge populacije organizama izložene su tvarima koje remete njihov normalan rast i razvitak, a dugoročno gledaju i narušavaju njihovu genetsku strukturu i varijabilnost.

One išćenje okoliša predstavlja sve veći problem i zahtijeva razvitak osjetljivih metoda za istraživanje u inka one išćenja na različitim razinama biološke organizacije. U zadnjih dvadesetak godina razvijene su mnoge metode za istraživanje genotoksičnosti odnosno utjecaja štetnih tvari na molekulu DNA. Jedna od njih je metoda nasumično umnožene polimorfne DNA (engl. random amplified polymorphic DNA) ili skraćeno RAPD. Tom je metodom moguće detektirati promjene u molekuli DNA umnažanjem slučajnih segmenata pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) te razdvajanjem umnoženih fragmenata elektroforezom u agaroznom gelu. Tako razdvojene elektroforetske vrpce stvaraju karakterističan „otisak prstiju“ (engl. DNA fingerprint). Usporedbom vrpca kontrolnih jedinki i jedinki izloženih one išćenju moguće je utvrditi stupanj polimorfizma DNA kao rezultat djelovanja potencijalno genotoksičnog spoja (Atienzar i Jha 2006). Uspoređuje se prisutnost ili odsutnost vrpca, kao i intenzitet svake vrpce između amplificiranih dijelova kontrolne DNA (neoštećene) i DNA koja je bila izložena nekoj štetnoj tvari ili se sumnja na njenu izloženost. Određene promjene u vrpcama mogu ukazivati na promjene nastale uslijed djelovanja genotoksičnih tvari na genom organizma. Metoda RAPD je, zbog svoje jednostavnosti, lakoće izvedbe i osjetljivosti prvo bila korištena u genetskom mapiranju, taksonomiji i filogeniji, a kasnije se počela koristiti u istraživanjima genotoksičnosti i karcinogeneze. Usporedbom s ostalim metodama, RAPD ima određenu prednost, jer ne zahtijeva poznavanje genomske sekvence, jeftina je i brz je pokazatelj promjena.

Unato čestom korištenju, potrebno je napraviti odgovarajuću optimizaciju metode kako bi bila u potpunosti pouzdana i kako bi se u svakom trenutku mogla ponoviti. Optimizirana, ova metoda ima potencijal detektirati široki opseg DNA oštećenja poput lomova, adukata, insercija, delecija, točkastih mutacija, te velikih genomskih rearanžmana. Nakon pretraživanja i detekcije oštećenja, važne vrpce u RAPD profilu potrebno je analizirati pomoću drugih tehnika, jer metoda RAPD može poslužiti za grubo skeniranje vidljivih promjena, a nikako kao pouzdani pokazatelj mehanizma genomskih promjena.

1. SVOJSTVA METODE RAPD

1.1. Princip rada metode

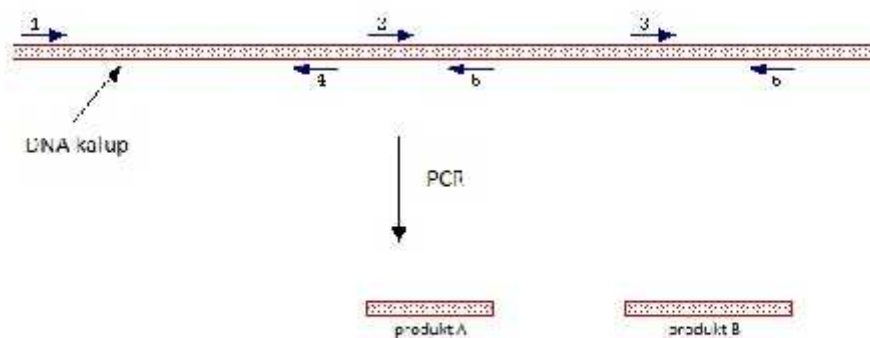
Standardni protokol za izvođenje metode RAPD koristi oligonukleotidne primere nasumične sekvence duge 10-12 baza (Atienzar i Jha 2006). Ovim protokolom moguće je amplificirati nekoliko nanograma ukupne genomske DNA pod uvjetima niske temperature vezivanja primera na kalup DNA koristeći PCR, a produkti se odvajaju na agaroznom gelu i vizualiziraju se etidij bromidom. Dekamerne primere za izvođenje RAPD metode su komercijalno dostupne (Bardakci 2001).

Važno je primijetiti da se metoda RAPD razlikuje od standardne PCR reakcije po tome što zahtjeva samo jednu primercu nasumične sekvence i što nije potrebno znanje o sekvenci koja se amplificira i proučava. S druge strane, na inamplifikacije i vizualizacije je isti kao kod izvođenja PCR reakcije (Bardakci 2001).

Pri odgovaranju o temperaturi, oligonukleotidne primere se nasumično vezati na komplementarne sekvence genomske DNA koje služe kao kalup i reakcijom PCR-a te se sekvence umnažati (amplificirati). Profil amplificirane DNA prvenstveno ovisi o tome kolika je homologija prisutna između kalupa DNA i primera, jesu li primere u pravilnoj orijentaciji jedna nasuprot drugoj i je li udaljenost među njima dovoljno velika (Atienzar i Jha 2006).

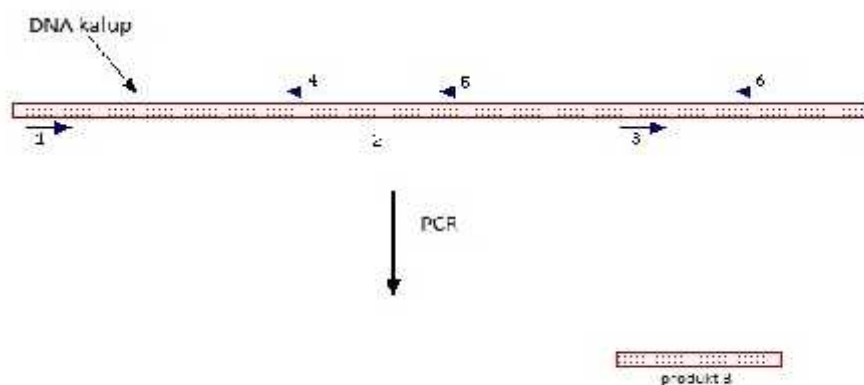
Na slici 1 prikazano je pravilno sparivanje po etnice koje daju određeni produkt. Po etnice na veznim mjestima označenim brojevima 2 i 5 daju produkt A, dok po etnice na veznim mjestima označenim brojevima 3 i 6 daju produkt B nakon PCR reakcije. Ukoliko koristimo genomsku DNA iz različitih izvora (npr. iz jedinke koja živi u istom okolišu i jedinke koja živi u drugačijem okolišu) kao kalup, varijacije u nukleotidnim sekvencama će se pokazati kao prisutnost odnosno odsutnost pojedinih vrpca na gelu, što je posljedica promijenjenog veznog mjesta po etnice (Slika 2.). Osim ovih promjena, moguće je detektirati i smanjen intenzitet vrpca na gelu, iako se ne zna točan uzrok ovakvoj promjeni. Smatra se da je jedan od uzroka smanjenog intenziteta vrpca slabija amplifikacija sekvence na istom veznom mjestu jednog od kalupa (Bardacki 2001). Sve promjene detektirane metodom RAPD nazivamo DNA polimorfizam (Slika 3.).

Polimorfizam se detektira također i pomoću SCAR analize (engl. sequence characterised amplified regions) koja otkriva moguće uzroke njegova nastanka. Pokazano je da su jedan od uzroka polimorfizma kromosomske aberacije, poput insercija i delecija, pa će stoga amplificirani produkti različitih alela heterozigota zbog različite duljine biti detektirani kao prisutnost odnosno odsutnost vrpce na gelu. RAPD markeri (produkti dobiveni amplifikacijom) su dominantni, što znači da se ne može razlikovati je li produkt amplificiran s dominantnog ili recesivnog alela nekog lokusa (Bardacki 2001).



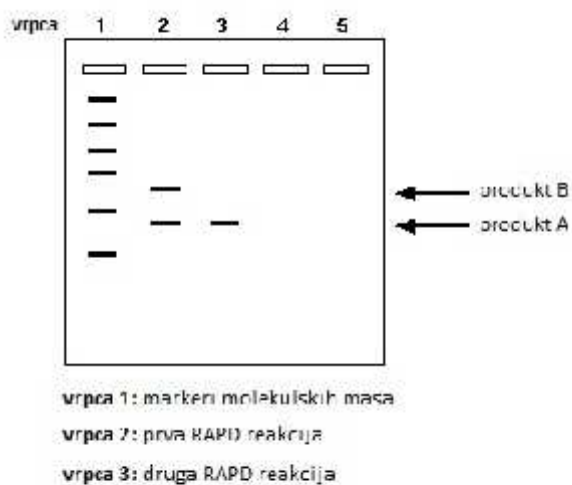
Slika 1. Prikaz RAPD reakcije s kalupom genomske DNA i mnogo kopija proizvoljne oligonukleotidne po etnice. Strelicama su prikazane kopije po etnice, a smjer strelice prikazuje smjer u kojem će se odvijati sinteza DNA. Brojevima su prikazana mjesta na DNA kalupu na koja se vežu po etnice. Mjesta vezanja po etnica označena brojevima 1, 2 i 3 se nalaze na gornjem lancu, dok se mjesta označena brojevima 4, 5 i 6 nalaze na donjem lancu kalupa

(preuzeto sa <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>).



Slika 2. Prikaz RAPD profila s kalupom iz drugog izvora. Vezno mjesto označeno brojem 2 je izmijenjeno i po etnica se ne može vezati na to mjesto i zajedno s po etnicom na veznom mjestu 5 dati produkt. U ovoj reakciji nastaje samo produkt B

(preuzeto sa <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>).



Slika 3. Detekcija RAPD polimorfizma na agaroznom gelu nakon PCR reakcije. U prvoj liniji se nalaze markeri molekularnih masa, u drugoj produkti dobiveni vezanjem po etnica 2 i 5 te 3 i 6 (Slika 1), dok se u trećoj nalaze produkti dobiveni vezanjem po etnica 3 i 6 (Slika 2).

Preuzeto sa <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>.

1.2. Ograničenja metode

Unatoč mnogim prednostima koje metoda RAPD ima pred ostalim metodama, postoje određeni problemi koji umanjuju sposobnost detekcije promjena. U negativnoj probi, koja ne sadrži DNA kalup, mogu se pojaviti lažni amplifikacijski produkti. Kritizirana je i slaba reproducibilnost metode, odnosno nemogućnost ponovnog dobivanja istih rezultata u dva različita laboratorija. U tom slučaju znanstvenici najčešće zaključuju da su razlike rezultat artefakata, kontaminacije ili mutacije u genomskoj DNA (Atienzar i Jha 2006).

Problemi mogu nastati i kada se RAPD koristi u determinaciji srodstva, jer se kod potomaka poznatog rodoslovlja mogu pojaviti vrpce koje nisu roditeljskog podrijetla. Pokazano je da izvor artefakata može biti molekula heterodupleksa koja se javlja između alelnih formi dvaju RAPD produkata. Svi ovi faktori se trebaju uzeti u obzir pri analizama rodoslovlja (Ayliffe i sur. 1994, citirano prema Atienzar i Jha 2006).

Različiti tipovi DNA lezija i mutacija mogu inducirati istu promjenu RAPD profila, pa su stoga potrebne druge metode za otkrivanje vrsta promjena na razini DNA (Atienzar i Jha 2006). Te metode uključuju detekciju DNA adukata, genskih mutacija ili citogenetičkih promjena. U području eko-genotoksikologije potrebno je uz RAPD metodu koristiti parametre na višoj organizacijskoj razini poput rasta, fitnesa i reprodukcije, budući da su neka istraživanja ukazala na njihovu povezanost (Atienzar i Jha 2006). Mnogo je potencijalnih faktora koji mogu utjecati na navedene promjene, te se oni intenzivno istražuju kako bi se poboljšala kvaliteta izvedbe same metode i analiza dobivenih rezultata.

2. OPTIMIZACIJA

Izvedba metode RAPD može se modificirati na mnoge načine, kako bi se poboljšala i dala jasnije rezultate. Nakon određene optimizacije, metoda je osjetljivija i preciznija, te ju je lakše ponoviti tako da daje iste rezultate.

2.1. Ponovljivost RAPD profila

Zbog slabe ponovljivosti, metoda RAPD se ponekad smatra nepouzdanom. Prije donošenja takvih zaključaka, u obzir se moraju uzeti svi parametri koji mogu utjecati na neponovljivost metode.

Ključnu ulogu u izvedbi RAPD metode ima kvaliteta izolirane DNA, pa je DNA manje kvalitete dovesti do nereproducibilnih rezultata (Atienzar i Jha 2006). Koncentracija DNA je također važna, jer je metoda RAPD izvedena s različitim količinama DNA davati i različite RAPD profile. Osim ovih parametara, važni su i količina i prisutnost magnezija, deoksinukleotid trifosfata (dNTP) i *Taq* polimeraze. Također je vrlo je važno koristiti istu termostabilnu *Taq* polimerazu.

Prije započinjanja pokusa, važno je znati kakav utjecaj na izgled DNA profila imaju ovi parametri. Osim toga, DNA profili se između laboratorija ne mogu uspoređivati sve dok se ne izvedu pod potpuno identičnim uvjetima. Kako bi se otkrio problem pojavljivanja lažnih vrpca u negativnoj kontroli, svaki sastavni dio PCR-a (osim enzima) tretiran je ultraljubičastim zračenjem (UV) (Atienzar i Jha 2006). DNA koja je izložena UV zračenju nije mogla služiti kao kalup i biti amplificirana, zbog nastanka timidinskih dimera koji koče djelovanje polimeraze. Unatoč odsustvu DNA kalupa, pronađene su vrpce u negativnoj kontroli, te je zaključeno da one nastaju kao posljedica nespecifične polimerizacije pomoću po etnica.

Ukoliko dakle imamo onečišćenu DNA, koja ne može služiti kao kalup, lažne vrpce u negativnoj kontroli se pojavljuju zbog nespecifičnog vezanja po etnica. Mnogobrojna istraživanja koja su rađena na filogenetski različitim skupinama organizama (bakterije, biljke, životinje) doprinijela su otkriću optimalnih uvjeta potrebnih za dobivanje ponovljivih rezultata RAPD metode (Atienzar i Jha 2006).

2.2. Utjecaj temperature vezanja po etnica

Pri izvođenju metode RAPD koriste se niske temperature vezanja po etnica (34-36 °C), kako bi se osigurao maksimalan broj vezanja po etnica i dobio veliki broj amplificiranih fragmenata. Upravo zbog tako blagih uvjeta događa se formiranje lažno pozitivnih vrpca na gelu.

isto a i prinos produkata reakcije ovise o nekoliko parametara me u kojima je i temperatura sparivanja po etnica. Pri temperaturama iznad i ispod optimalnih, može do i do formiranja nespecifi nih produkata i do smanjenog prinosa reakcije. U istraživanju Atienzar i Jha (2006) dobiveni su reproducibilni rezultati pri temperaturi vezanja po etnica od 50 °C , što je kontradiktorno prijašnjim istraživanjima Williams i sur. (1990) koji tvrde da temperatura vezanja po etnica iznad 40 °C smanjuje amplifikaciju DNA segmenata. Cilj istraživanja Atienzar i Jha (2006) bio je definirati uvjete reakcije uzastopnim pove anjem temperature vezanja po etnica i tako optimizirati reakciju. Prednost takvih strogo definiranih uvjeta je ta što su znatno smanjene nespecifi ne reakcije umnažanja. Korisnicima tehnike RAPD stoga se savjetuje primjena visoke temperature sparivanja po etnica (50 °C) ukoliko se koriste dekamerne po etnice.

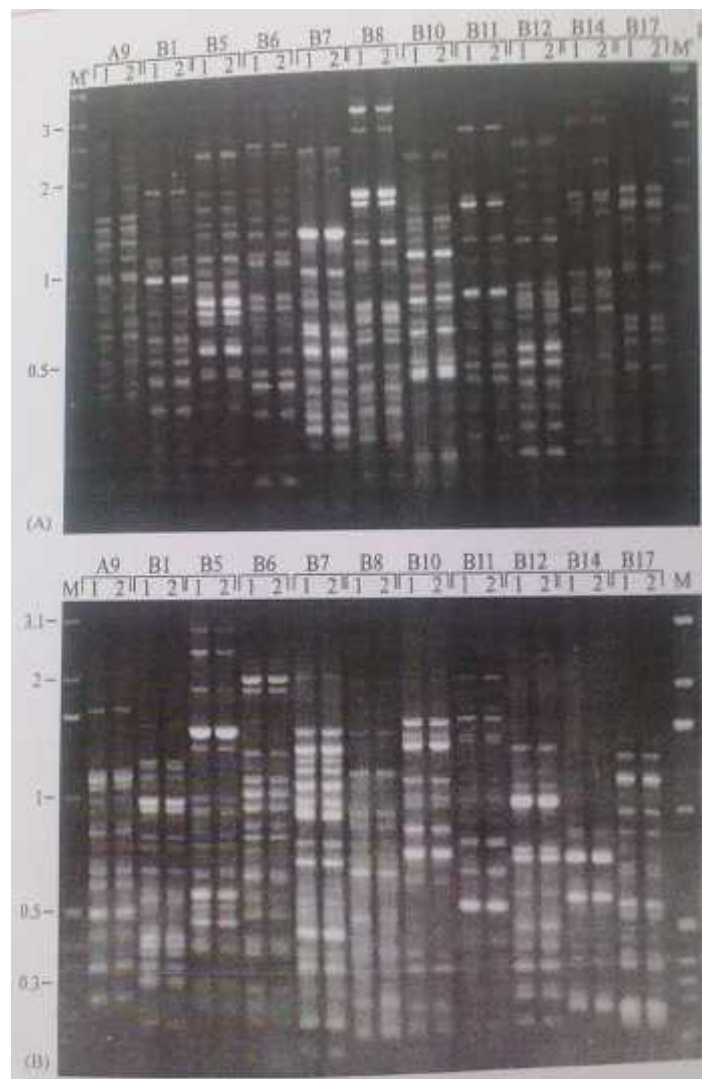
2.3. Utjecaj PCR komponenti

Genomska DNA dobre isto e, koja ne sadrži druge makromolekule i potencijalne inhibitorne tvari, davat e iste RAPD profile koji mogu poslužiti kao dobar po etak dijagnoze odre enih promjena. Intenzitet vrpce na profilu ovisit e o efikasnosti vezanja genomske DNA i po etnice u prvim koracima reakcije. Ukoliko DNA nije dobro pro iš ena, s njom zaostaju dijelovi stanice koji se vežu za po etnice ili polimerazu te tako ometaju reakciju polimerizacije. Pokazano je da DNA pro iš ena prema standardnom fenol/kloroform protokolu daje profile dobre kvalitete (Atienzar i Jha 2006).

Za dobivanje ponovljivih RAPD profila jako važan faktor je i koncentracija DNA kalupa kojeg koristimo. Taj faktor je bitan kako bi se osigurao najve i broj amplificiranih produkata i potvrdila vjernost uvjeta PCR reakcije. Ukoliko se profili iz istog DNA kalupa me usobno razlikuju, kao i profili iz DNA razli itih jedinki iste vrste, PCR reakcija treba biti ponovljena tako da se koriste dvije razli ite koncentracije DNA kalupa, koje se me usobno razlikuju za faktor 2. Ako se profili nakon ponovljenog pokusa i dalje razlikuju, rezultate treba gledati sa dozom skepticizma.

Za provjeru ponovljivosti reakcije koristi se 5 ng i 20 ng genomske DNA (Atienzar i Jha 2006). U istraživanju Benter i sur. (1995) je pokazano da su dobiveni druga iji rezultati RAPD-a (vrpce razli itog intenziteta) kada se DNA izolirala jedan dan, a amplifikacija te iste DNA radila drugi dan (Benter i sur. 1995, citirano prema Atienzar i Jha 2006).

Oligomerne po etnice su krucijalne za uspjeh RAPD protokola. U provedenim istraživanjima (Atienzar i sur. 2000, citirano prema Atienzar i Jha 2006), korištenjem seta od 11 po etnica, uspješno su dobiveni profili svake genomske DNA koja je prouavana, a potječe od filogenetski različitih skupina organizama (bakterije, biljke, životinje). Ovaj set po etnica ima potencijal dati RAPD profile iz bilo koje genomske DNA dostatne kvalitete (Slika 4.). Zaključak ovih istraživanja je da je moguće dobiti profile visoke kvalitete korištenjem različitih po etnica i jedinki različitih vrsta pod istim optimiziranim uvjetima reakcije. Nepotrebno je imati različite PCR uvjete za svaku vrstu i za svaku kombinaciju po etnica.



Slika 4. RAPD profili organizama *Daphnia magna* (A) i *Escherichia coli* (B). Po etnice su označene na gornjoj strani gela (A9-B17). Linija 1 označava 20 ng DNA, a linija 2 označava 5 ng DNA. M i M' označavaju markere molekularnih masa. Na lijevoj strani gela označene su molekularne veličine (kb). Korišten je isti set po etnica (preuzeto iz Atienzar i Jha 2006).

Koncentracija magnezijevih iona između 3-6 mM pokazuje zadovoljavajuću u ponovljivost rezultata. Viša koncentracija magnezija može poboljšati stabilnost RAPD obrasca, kao i viša koncentracija *Taq* polimeraze. Za uspješnu ponovljivost rezultata je, osim koncentracije enzima, važno koristiti uvijek istu vrstu termostabilne polimeraze. Nespecifične reakcije polimerizacije koje se vide kao lažne vrpce u negativnoj kontroli, a nastaju u odsustvu DNA kalupa, uvelike se mogu reducirati promjenom koncentracije dNTP-a između identičnih reakcijskih smjesa (Atienzar i Jha 2006).

3. PRIMJENA METODE RAPD

3.1. Istraživanje genotoksičnosti

Već je spomenut veliki značaj metode RAPD u dijagnosticiranju promjena koje su se dogodile u genomu jedinki koje su bile izložene štetnim tvarima iz okoliša. Genotoksične tvari iz okoliša mogu na različite načine djelovati na genomsku strukturu prirodnih populacija.

Prvo istraživanje genotoksičnosti u inku pomoću metode RAPD napravili su Savva i sur. (1996, citirano prema Atienzar i Jha 2006). Istraživanjem je proučeno utjecaj benzo(a)pirena na genom štakora. Od tada se pomoću ove metode istraživao utjecaj različitih tvari: metala (olovo, mangan, kadmij, bakar), mitomycina C, 4-n-nonilfenola, UV zraka, X-zraka, gama zraka i radionuklida na genome različitih vrsta životinja i biljaka (Atienzar i Jha 2006). Jedno od istraživanja provedeno je na ribici *Danio rerio* (Zhiyi i Haowen 2004), gdje se ispitivao utjecaj genotoksičnih kemikalija ciklofosfamida i dimetoata. Rezultati su pokazali promjene u RAPD profilu, odnosno DNA polimorfizam u smislu gubitka stabilnih vrpca. Pri istraživanju genotoksičnosti vrlo je važan odabir vrste na kojoj se radi, kao i genetička raznolikost između jedinki iste vrste. Poznavanje genetičke varijabilnosti unutar vrste, omogućuje istraživaču pravilnu analizu DNA profila.

Kemijske i fizikalne tvari u okolišu reagiraju s genomskom DNA direktno (uzrokuju lomove, adukte, točkaste mutacije, velike strukturne promjene genoma) ili indirektno (utječu na promjenu u genetičkom sastavu populacije).

Tablica 1. sažeto prikazuje moguće i u inke strukturnih promjena DNA na RAPD profile. Prisutnost oštećenja i mutacije u molekuli DNA unutar veznog mjesta po etnice uzrokovat će drugačiji DNA profil od molekule DNA koja je neoštećena. Takav događaj bit će rjeđi od direktnog utjecaja oštećenja DNA koje se nalazi izmeđ u veznih mjesta po etnica na RAPD profil. To se događa zato što je vezno mjesto po etnica kratko (10 parova baza), dok je DNA koja se nalazi izmeđ u tih mjesta i amplificira se duga oko 3-4 kb (kilobaze), te su šanse da mutacija zahvati taj dio molekule puno veće.

DNA lezija će imati veći utjecaj na RAPD profil od točastih mutacija, zato što se točaste mutacije moraju dogoditi na veznom mjestu po etnica kako bi direktno utjecale na izgled profila. Kada DNA polimeraza dođe do mjesta oštećenja, ishodi mogu biti različiti: blokiranje amplifikacije, prelazak preko oštećenja i nastavak amplifikacije ili disocijacija kompleksa enzima i molekule DNA na mjestu oštećenja. Svi ti događaji uzrokovat će promjene u RAPD profilima izmeđ u istih molekula DNA iz različitih izvora.

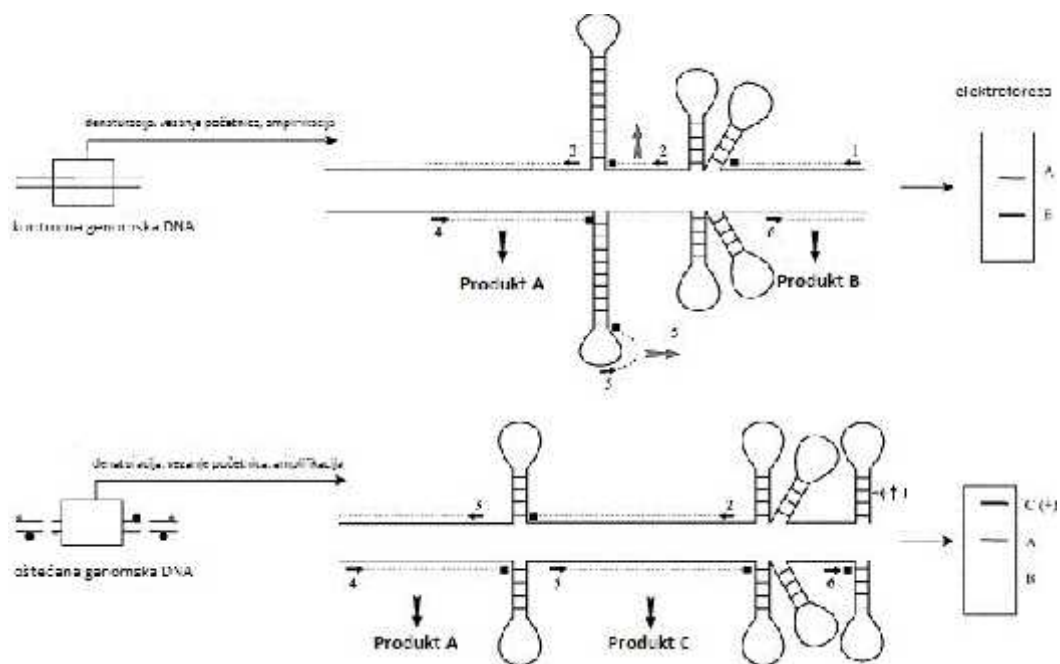
Lomovi u DNA kalupu koji nastanu izmeđ u dvije po etnice koje su u pravilnoj orijentaciji jedna nasuprot drugoj mogu rezultirati gubitkom amplikona (amplificiranog dijela DNA). S druge strane, veći rearanžmani u genomu ali i točaste mutacije mogu biti odgovorni za gubitak vrpca ili mogu stvoriti novo mjesto vezanja po etnica, što rezultira pojavom novih vrpca. Upravo su preraspodjele unutar genoma najučestalije promjene koje utječu na izgled profila, a posebno one koje vode nastanku novih vrpca. Varijacije u intenzitetu vrpca zbog različitih DNA oštećenja, kao i metilacija DNA, također mogu utjecati na razlike u RAPD profilima (Atienzar i Jha 2006).

Tablica 1. Izravan utjecaj oštećenja DNA na RAPD profile (prilagođeno prema Atienzar i Jha 2006).

Promjene u DNA	Posljedice	Utjecaji na RAPD profile	moгуćnost detekcije promjene metodom RAPD
 <p>oštećenje DNA</p>	<ul style="list-style-type: none"> > zaobilazak > utjecaj na procesivnost polimeraze > zaobilazak > nema utjecaj na procesivnost polim. > blokiranje > disocijacija kompleksa enzim > blokiranje > disocijacija > višak slobodne polime. > blokiranje > nema disocijacije > nema vezanja početnice [oštećenje unutar veznog mjesta] 	<ul style="list-style-type: none"> > smanjenje intenziteta vrpce/gubitak vrpce > nema efekta > gubitak vrpce > povećanje intenziteta vrpce > gubitak vrpce > gubitak vrpce 	<ul style="list-style-type: none"> srednje niska srednje niska niska
 <p>lom u molekuli DNA</p>	<ul style="list-style-type: none"> > blokiranje > disocijacija kompleksa enzim-DNA 	<ul style="list-style-type: none"> > gubitak vrpce 	<ul style="list-style-type: none"> niska
 <p>točkasta mutacija</p>	<ul style="list-style-type: none"> > nema vezanja početnice > stvaranje novog mjesta vezanja početnica 	<ul style="list-style-type: none"> > gubitak vrpce > pojava vrpce 	<ul style="list-style-type: none"> niska niska
 <p>mjesto vezanja početnice</p>	<ul style="list-style-type: none"> > gubitak postojećeg mjesta vezanja početnica > novo bazno mjesto početnica 	<ul style="list-style-type: none"> > gubitak vrpce > pojava vrpce 	<ul style="list-style-type: none"> niska velika
 <p>genomske izmjene</p>			

Strukturne promjene u molekuli DNA mogu dovesti do promjena u RAPD profilima (Atienzar i Jha 2006). Određeni dijelovi DNA sekvence, primjerice područja bogata GC parovima baza, mogu sadržavati sekundarne strukture poput ukosnica, koje se ne mogu amplificirati (Slika 5). Ukoliko je DNA neoštećena (kontrolna DNA), po etnicama 3 i 4 se amplificirati produkt A, dok se po etnicama 1 i 6 daju produkt B nakon elektroforeze. Po etnicama 2 i 5 ne daju se amplifikon, jer prisutnost ukosnice ometa njihovo vezanje i amplifikaciju DNA (Slika 5, gornji crtež).

Na donjem crtežu sa slike 5 prikazana je amplifikacija oštećene DNA, koja je po sekvenci jednaka kontrolnoj DNA. Zbog određenih strukturnih promjena koje su se dogodile u molekuli, po etnicama 1 i 6 više ne mogu dati produkt, a pojavio se novi produkt C, kao rezultat djelovanja po etnicama 2 i 5. Produkt A se i dalje može normalno amplificirati pomoću po etnicama 3 i 4. U tom slučaju imamo pojavu nove vrpce (produkt C) i gubitak jedne stare vrpce (produkt B).



Slika 5. Strukturne promjene molekule DNA i njihov utjecaj na RAPD profile (prilagođeno prema Atienzar i Jha 2006).

Utvrđeno je da se promjene u molekuli DNA uzrokovane toksinima iz okoliša ne događaju nasumično, nego da postoje „vruća mjesta“ interakcije toksina i genomske DNA, tako da će se u tom slučaju stvarati uvijek ista vrsta strukturne promjene (Rodriguez i Loechler 1993, Cairns i Murray 1994, citirano prema Atienzar i Jha 2006). Upravo iz tih razloga je metoda RAPD tako učinkovita u detekciji tih karakterističnih promjena.

3.2. Istraživanje promjene genetičke strukture populacija

Osim za detekciju promjena koje su se dogodile u molekuli DNA, metoda RAPD se koristi za istraživanje promjena genetičke raznolikosti i frekvencije gena i genotipova, koje se događaju na razini populacije. Štetni agensi mogu dovesti do povećanja smrtnosti, smanjenja reproduktivne sposobnosti zbog nemogućnosti parenja, pa čak i do selekcijskog pritiska i u slučaju uskog grla (engl. bottle-neck effect) u heterogenoj populaciji (Atienzar i Jha 2006). Kao posljedica tih promjena, mijenja se genetička raznolikost populacije, a time i sveukupna genetička struktura odnosno učestalost gena i genotipova..

Metoda RAPD se koristi za detekciju geneti ke raznolikosti me u populacijama koje su bile izložene okolišnim zaga iva ima. Tako je napravljeno istraživanje geneti ke raznolikosti populacije školjkaša *Perna viridis* L. (Yap i sur. 2006) sa podru ja one iš enog metalima (kadmij, bakar, olovo i cink) u odnosu na populacije sa relativno nezaga enih podru ja. Promjena u geneti koj strukturi koju izazivaju teški metali esto rezultira promjenom geneti ke raznolikosti koja nastaje kao posljedica selekcije zbog tolerancije na toksi nu tvar ili zbog efekta utemeljitelja (engl. founder effect) tj. ponovnog osnivanja populacije malim brojem preživjelih jedinki. Smanjena geneti ka raznolikost u populacijama izloženim toksi nim tvarima može imati dugoro ne biološke posljedice, kao što je brže izumiranje u promijenjenom okolišu zbog slabije mogu nosti iskorištavanja resursa iz okoliša (Yap i sur. 2006).

Istraživanja geneti ke ekotoksikologije fokusiraju se ili na izravan u inak genotoksi nih tvari na DNA ili na neizravan u inak u smislu promjene geneti ke varijabilnosti. Prema Theodorakis (2001), korištenje oba pristupa donijelo bi napredak iz nekoliko razloga. Ukoliko veli ina promjene geneti ke strukture populacije odgovara koli ini ošte enja DNA, to može služiti kao dokaz da su te promjene nastale prilikom izlaganja štetnoj tvari. Ukoliko se frekvencije alela razlikuju izme u kontrolne populacije i one koja je one iš ena genotoksi nom tvari, povezanost odre ene koli ine DNA ošte enja i genotipa može dokazati da su promjene u genotipu uzrokovane selekcijom koja je inducirana štetnom tvari. Analiza protoka gena daje uvid u doga aje koji mogu prikriti razlike izme u one iš ene i kontrolne populacije. (Theodorakis 2001, citirano prema Atienzar i Jha 2006).

3.3. Istraživanje karcinogeneze

Brojna istraživanja su pokazala da se metoda RAPD može uspješno koristiti za detekciju genomske nestabilnosti u tumorskim stanicama. Razina aneuploidije u genomu tumorskih stanica iskazuje se razinom intenziteta vrpca na gelu u usporedbi s vrpcama dobivenim iz normalnog diploidnog genoma iste jedinke. Pažljivim uskla ivanjem koncentracija DNA kalupa mogu e je, promjenom u intenzitetu vrpca, detektirati pojavu odnosnu gubitak broja kopija odre ene sekvence (Atienzar i Jha 2006). Takvo svojstvo je vrlo korisno u prou avanju geneti kih doga aja tijekom procesa transformacije iz normalne u tumorsku stanicu.

Metodom RAPD je moguće detektirati genomsku nestabilnost, jer se tumorske stanice proizvode klonovima stanica koje se neprestano dijele, pa se zato bolje detektiraju na profilu jer ih je više zahvaćeno promjenom. S druge strane u organizmu koji je bio izložen štetnoj tvari, manji broj stanica može biti zahvaćen i oštećenje se ne može biti detektiran ukoliko je zahvaćenost ispod 2% (Jones i Kortenkamp 2000, citirano prema Atienzar i Jha 2006).

Mnogobrojna istraživanja koriste metodu RAPD kako bi se procijenila genomsku nestabilnost u tumorima jetre kod transgenih miševa, hepatocelularnim tumorima i tumorima oralnih epitelnih stanica. Metoda RAPD ima dobru primjenu u istraživanjima tumora dojke, adenoma hipofize, raka kože, kolorektalnog tumora, tumora epitelnih stanica vrata i glave i mnogih drugih vrsta tumora kod ovjeka i miša (Ribeiro i sur. 2004, Luceri i sur. 2000, Wang i sur. 2002, Luo i sur. 2003, Maeda i sur. 1999; citirano prema Atienzar i Jha 2006).

Kod istraživanja karcinogeneze metodom RAPD uspoređuju se DNA profili iz normalnih i tumorskih stanica, te se svaka zapažena promjena pripisuje genomskoj nestabilnosti. Kako bi se otkrio molekularni mehanizam koji se krije iza tih promjena, rade se daljnje analize. Važne vrpce se mogu izrezati i iznova amplificirati, kako bi poslužile kao probe kojima se skenira genom izoliran iz kontrolnih i tumorskih stanica (Atienzar i Jha 2006).

Na taj način je do sada otkriveno mnogo molekularnih zbivanja u genomu tumorskih stanica, kao što su pojava i gubitak alela, somatske delecije određenih sekvenci i gubitak alela na kromosomu 2q (Peinado i sur. 1992, Ionov i sur. 1993, Kohno i sur. 1994, citirano prema Atienzar i Jha 2006). Detaljnijom analizom alela koji se gube može se otkriti prisutnost tumor supresorskih gena. Jednako tako, analizom alela koji se pojavljuju može se otkriti prisutnost onkogena, odnosno gena uključenih u inicijaciju i progresiju tumora. Oboje može voditi otkrivanju i opisivanju novih gena ili gena s nedovoljno istraženom funkcijom.

Genomska nestabilnost je ključna karakteristika tumorskih stanica, a ona može biti posljedica toksičnih mutacija, delecija i promjena gena važnih u kontroli staničnog ciklusa. RAPD je dobra metoda za skeniranje genoma tumorskih stanica zbog mnogo razloga: može detektirati većinu mutacija koje se pojavljuju u tumorskim stanicama, jednim pokusom je moguće detektirati i klonirati promjenu u molekuli DNA, nije potrebno znanje o sekvenci genomske DNA koja se proučava i najvažnije od svega, daljnjom analizom moguće je otkriti molekularna zbivanja uključena u genomsku nestabilnost (pojava i gubitak alela), kao i gene koji imaju ključnu ulogu u inicijaciji i razvoju malignosti (Atienzar i Jha 2006).

4. USPOREDBA S OSTALIM METODAMA

U području toksikologije i ekotoksikologije, metoda DNA chipova (engl. DNA microarray) vrlo je važna u analizi ekspresije gena. U budućnosti će DNA chipovi s probama za pojedine kromosome biti dostupni za detekciju genomskih izmjena i pitanje je hoće li se RAPD metoda još koristiti kraj ovakvih metoda visoke tehnologije. Za pretpostaviti je ipak da će se metoda RAPD i dalje koristiti iz najmanje dva razloga.

Osim što je relativno jeftina, metoda RAPD skenira cijeli genom uključujući i nekodirajuće regije, što je u suprotnosti sa analizom DNA mikro chipova kojom se istražuju promjene na razini pojedinih gena. Koristi li se analizu DNA mikro chipova teško je postići istovremenu detekciju i kloniranje promjena, pa će zbog toga metoda RAPD još dugo ostati u upotrebi, dopunjujući nove tehnologije (Atienzar i Jha 2006).

Usporedbom metode RAPD s ostalim testovima mutagenosti, kao što je Ames-test, otkriva se da je metoda RAPD manje osjetljiva. Iako manje osjetljiva, ona i dalje ima prednost zato što detektira mutacije u cijelom genomu, dok se Ames-ovim testom mutagenost istražuje na malom dijelu ciljane DNA (Jones i Kortenkamp 2000, citirano prema Atienzar i Jha 2006).

Genotoksičnosti u incij se mogu procijeniti i upotrebom citogenetičkih i molekularnih metoda koje, uz RAPD, uključuju i analizu izmjene sestrinskih kromatida (SCE), te kromosomskih aberacija (Cabs). Prema dosadašnjim istraživanjima RAPD metoda je osjetljivija od SCE metode, i jednako osjetljiva kao i Cabs metoda (Atienzar i Jha 2006).

Usporedbe metode RAPD sa testovima mutagenosti/genotoksičnosti koji se rutinski koriste su važne, jer se na taj način ispituje sposobnost metode RAPD u detekciji promjena nastalih u molekuli DNA. Važno je znati da je RAPD kvalitativna, odnosno semi-kvantitativna metoda, što znači da se o količini i prirodi efekata koje genotoksične tvari ostavljaju na DNA može samo nagađati. Stoga se promjene nastale u RAPD profilima moraju dalje analizirati kloniranjem, sekvenciranjem te upotrebom različitih proba (Atienzar i Jha 2006).

5. SAŽETAK

S ciljem detekcije oštećenja genoma uzrokovano štetnim tvarima iz okoliša razvijene su mnoge metode koje omogućuju brzi pregled molekule DNA izloženih organizama. Među njima je i metoda RAPD (engl. random amplified polymorphic DNA), koja se često koristi jer je jednostavna, učinkovita i brza. Osim u istraživanjima genotoksičnosti, metoda RAPD se koristi i u proučavanju karcinogeneze i populacijsko-genetičkim istraživanjima.

U ovom radu su prikazane osnovne karakteristike metode RAPD i navedena su polja njezine primjene. Prikazani su nedostaci metode i načini na koje se može poboljšati, kao i usporedba te metode sa ostalim metodama koje se danas koriste. Nakon neophodne optimizacije, ova metoda je siguran i točan pokazatelj promjena u genomu, a u kombinaciji s drugim metodama daje jasan uvid u molekularno-genetička zbivanja.

6. SUMMARY

In order to detect genome damage caused by harmful substances from the environment, many methods which enable fast overview of the DNA molecules of exposed organisms have been developed. Among them is the RAPD (random amplified polymorphic DNA) method, which is used frequently because it is simple, efficient and quick. Apart from genome-toxicity related research, RAPD is also used in the study of carcinogenesis and in the population-genetic studies.

The main characteristics of the RAPD method and the areas of its application were specified in this paper. The disadvantages of the method and the ways of its improvement were shown, along with the comparison of the method with other methods used nowadays. After the necessary optimization, this method could be safe and precise indicator of the genome changes, and combined with other methods it gives a clear insight into molecular-genetic events.

7. LITERATURA

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, 76-102.

Bardakci F., 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Review Article. *Turkish Journal of Biology* 25, 185-196.

Williams W.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.

Yap C.K., Chua B.H., Teh C.H., Tan S.G., Ismail A., 2006. Patterns of RAPD Markers and Heavy Metal Concentrations in *Perna viridis* (L.), Collected from Metal-Contaminated and Uncontaminated Coastal Waters: Are They Correlated with Each Other? *Russian Journal of Genetics* 43, 544-550.

Zhiyi R., Haowen Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 96-103.

<http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>.

http://klinkemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol05_1-1995/02_Straus_Karcinogeneza_Vol05_1-1995.pdf