

RAPD jako metoda różnicowania i identyfikacji drożdży

Małgorzata Robak, Katarzyna Baranowska, Wojciech Barszczewski, Maria Wojtatowicz

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Wrocław

RAPD as a tool for differentiation and identification of yeast

Summary

The growing importance of yeast in food and beverages creates a necessity for a rapid and reliable method for typing of strains. As described in the present review, Randomly Amplified Polymorphic DNA method (RAPD), based on genome sequence diversity, allowed the differentiation and identification of strains belonging to *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Yarrowia* and other yeasts occurring in beer, wine, cheeses, sausages, dressings and fruits. The applied methodology and obtained results were compared and analysed in terms of repeatability and reproducibility. The possibility to compile the results in a database, which will serve the future identification of unknown strains, was discussed.

Key words:

RAPD, yeast differentiation, yeast identification, food microbiological analysis.

1. Wstęp

Drożdże, stosowane bezwiednie już przez starożytnych Egipcjan do wypieku pieczywa i produkcji napojów alkoholowych, są niewątpliwie jedną z najważniejszych grup drobnoustrojów występujących w przyrodzie i wykorzystywanych przez człowieka. W najnowszej klasyfikacji taksonomicznej jest ich ponad 700 gatunków (1). Tradycyjne metody identyfikacji izolatów drożdży zostały oparte na podstawie zróżnicowanych testów wykorzystujących odmienne właściwości fizjologiczne i morfologiczne poznanych gatunków drożdży. Najczęściej stosowane są testy

Adres do korespondencji

Małgorzata Robak,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza,
ul. Norwida 25,
50-375 Wrocław;
e-mail:
mrob@ozi.ar.wroc.pl

biotechnologia

4 (71) 142–155 2005

API 32C (bio-Merieux, Francja). Metoda ta, podobnie jak inne oparte na testach fizjologicznych, bywa jednak zawodna. Zdarzają się odmienne wyniki po 24 i 48 h dla tej samej próby (2). Dlatego, między innymi, wzrasta zainteresowanie technikami biologii molekularnej, zwłaszcza opartymi na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (3,4). Metody te są proste w wykonaniu i możliwa jest ich automatyzacja. W ostatnim dziesięcioleciu, na podstawie reakcji PCR, opisanej w 1986 r. przez Mullisa i wsp. (5), opracowano wiele nowych metod badawczych. Jedną z nich jest RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), czyli losowa amplifikacja polimorficznego DNA.

Metoda RAPD została po raz pierwszy zastosowana w 1990 r. przez Williamsa i wsp. (6). Podobnie jak PCR zachodzi ona w trzech kolejnych etapach – denaturacja matrycy, przyłączanie primerów i wydłużanie łańcucha DNA, które przeprowadzane są w ściśle określonej liczbie powtórzeń. Podstawową różnicą pomiędzy PCR a RAPD jest użycie w tej drugiej pojedynczego, krótkiego oligonukleotydu starterowego o długości 5-15 nukleotydów. Primer ten zawierający dowolnie wybraną sekwencję nukleotydów, przyłącza się do obu nici DNA w wielu miejscach, generując powstanie od kilku do kilkunastu produktów amplifikacji.

Metoda RAPD była stosowana do identyfikacji i różnicowania wielu organizmów (3,7-13). Bardzo obiecujące są jej aplikacje w technologii żywności, a możliwość przechowywania obrazów rozdzielców elektroforetycznych w postaci zdjęć w komputerowej bazie danych, umożliwi identyfikację i różnicowanie szczepów przez porównanie profili elektroforetycznego rozdziału produktów reakcji RAPD. Ponadto, za pomocą stosownego oprogramowania, na bazie zgromadzonych wyników można wyznaczać podobieństwo i tworzyć dendrogramy pokrewieństwa badanych mikroorganizmów (drzewka filogenetyczne).

W pracy omówiono zastosowanie RAPD w analizie drożdży występujących w przemyśle fermentacyjnym, mleczarskim, mięsnym oraz innych gałęziach przetwórstwa spożywczego. W kolejnych trzech rozdziałach, podkreślając znaczenie tych metod w identyfikacji drożdży, zaprezentowano dotychczasowe osiągnięcia w zakresie różnicowania szczepów: 1) *Saccharomyces*, 2) *Hanseniaspora* i 3) innych rodzajów drożdży. Szczegółową metodykę zastosowaną w cytowanych publikacjach zebrano w trzech tabelach obejmujących szczepy drożdży występujące w winie, piwie oraz innych produktach spożywczych. Krytyczną analizę tej metodyki oraz porównanie wyników otrzymanych w różnych ośrodkach przeprowadzono w kolejnym rozdziale.

2. Identyfikacja i różnicowanie izolatów z rodzaju *Saccharomyces*

Metodą RAPD różnicowano i identyfikowano browarnicze i gorzelnicze szczepy *S. cerevisiae* (14), szczepy z rodzaju *Saccharomyces* wyizolowane z moszczy gronowych w Portugalii (15), z angielskich piw „ale” i jasnych pełnych typu „lager” (16),

drożdże zanieczyszczające wina oraz piwa (17,18), a także izolaty drożdży z serów (19,20). W analizach wykorzystano rozmaite startery: primer 21 (16,18); AB1-09, AB1-12, AB1-15 i P20 (15); primer 24, primer 28, OPA-11 (17); M13 (19,20); (GAC)₅ i (GTG)₅ (17,21,22); OPB-02, OPB-10 do OPB-13, OPB-17 oraz OPB-20 (14,23); otrzymując dla każdego ze szczepów kilka do kilkunastu produktów amplifikacji o zróżnicowanej wielkości od 300 do 3000 pz (par zasad). Dla danego szczepu, w analizie RAPD z wybranym starterem, uzyskiwano charakterystyczny tak pod względem ilości jak i wielkości prążków, wzór rozdziału elektroforetycznego powielonego DNA.

Tabela 1

Metodyka RAPD dla drożdży winiarskich

Przedmiot badań Pozycja bibliograficzna	Primer: Sekwencja	Skład mieszaniny reakcyjnej	Warunki kolejnych etapów PCR
1	2	3	4
<i>S. cerevisiae</i> IGC 4455 izolaty z win (6 szczepów) Baleiras Couto i wsp., 1996 (17)	primer 24: GCGTGACTTG primer 28: AGGAGGAGGA OPA-11: CAATCGCCGT (GTG) ₅ (GAC) ₅	primer 0,2 µM DNA 0,25 ng Taq DNA polimeraza 1 U dNTP 200 µM Tris-HCl (pH 8,3) 20 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 3 mM żelatyna 0,001% V = 50 µl	predenaturacja: 94°C, 5 min 40 cykli: 94°C, 15 s 45°C, 45 s dla (GAC) ₅ 55°C, 45 s dla (GTG) ₅ 72°C, 1 min zakończenie: 72°C, 1 min 30 s
dwa szczepy rodzicielskie <i>S. cerevisiae</i> oraz produkty fuzji proto- plastów Martins i wsp., 1999 (23)	OPB-12 OPX-10 (nie podano sekwencji)	primer 30 ng DNA 40 ng Taq DNA polimeraza 1,5 U dNTP 100 µM Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM KCl 4,5 mM MgCl 3,75 mM V = 25 µl	predenaturacja: 92°C, 2 min 40 cykli: 92°C, 1 min 37°C, 1 min 72°C, 2 min zakończenie: 72°C, 3 min
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>capensis</i> <i>S. cerevisiae</i> var. <i>montuliensis</i> <i>S. cerevisiae</i> var. <i>cbevalieri</i> <i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> <i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> var. <i>uvarum</i> Xufre i wsp., 2000 (15)	AB1-09 AB1-12 AB1-15 P20 (nie podano sekwencji)	primer 0,3 ng DNA 100 ng Taq DNA polimeraza 2,5 U dNTP 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) 67 mM MgCl ₂ 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 16,6 mM V = 20 µl	predenaturacja: 94°C, 4 min 45 cykli: 94°C, 1 min 36°C, 1 min 72°C, 2 min
<i>S. cerevisiae</i> (30 szczepów) <i>Kloeckera apiculata</i> (30 szczepów) Caruso i wsp., 2002 (21)	(GAC) ₅ (GTG) ₅	nie podano	jak w: Baleiras Couto i wsp., 1996 (17)

1	2	3	4
izolaty <i>Hanseniaspora/Kloeckera</i> (18 szczepów) szczepy referencyjne: <i>Hanseniaspora osmophila</i> <i>H. uvarum</i> <i>H. valbyensis</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. occidentalis</i> <i>H. vineae</i> Bujdosó i wsp., 2001 a,b (24,25)	M13: GAGGGTGGXGGXTCT RM13: AGAXCCXCACCCTC OPA-01: CAGGCCCTTC OPA-03: AGTCAGGCAC OPA-09: GGGTAACGCC OPA-08: GTGTGCCCCA	primer 0,4 µM DNA 1,25 µg Taq DNA polimeraza 5 U Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM dTNP 200 µM KCl 50 mM MgCl ₂ 2 mM V = 25 µl	predenaturacja: 94°C, 3 min 40 cykli: 94°C, 30 s 45°C, 1 min 72°C, 2 min 20 s zakończenie: 72°C, 7 min predenaturacja: 94°C, 1 min 45 cykli: 94°C, 1 min 36°C, 1 min 72°C, 2 min zakończenie: 72°C, 8 min

Tabela 2

Metodyka RAPD dla drożdży browarnych i gorzelnicznych

Przedmiot badań Pozycja bibliograficzna	Primer: Sekwencja	Skład mieszaniny reakcyjnej	Warunki kolejnych etapów PCR
drożdże browarne (5 szczepów) drożdże gorzelnicze (5 szczepów) Gomes i wsp., 2000 (14)	OPB-02: TGATCCCTGG OPB-10: CTGCTGGGAC OPB-11: GTAGACCGT OPB-12: CCTTGACGCA OPB-13: TTCGCCGCT OPB-17: AGGGAACGAG OPB-20: GGACCCTTAC	primer 0,2 µM DNA 40 ng Taq DNA polimeraza 1,5 U dNTP 100 µM Tris-HCl (pH 8,0) 20 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 3,75 mM V = 25 µl	40 cykli: 92°C, 1 min 37°C, 1 min 72°C, 2 min
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (12 szczepów wzorcowych) drożdże browarne (25 szczepów) Tornai-Lehoczki i Dlauchy, 2000 (16)	21: GCTCGTCGCT	primer 20 ng DNA 1-5 ng Taq DNA polimeraza 1 U dNTP 200 µM Tris-HCl (pH9,0) 10 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 2 mM Triton X-100 1% V = 15 µl	predenaturacja: 93°C, 3 min 35 cykli: 93°C, 1 min 38°C, 1 min 72°C, 2 min zakończenie: 72°C, 5 min
szczepy referencyjne: <i>S. cerevisiae</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. exiguus</i> izolaty z linii produkcyjnej piwa (20 szczepów) Barszczewski i Robak, 2004 (18)	21: GCTCGTCGCT	primer 0,33 µM DNA ~ 20 ng Taq DNA polimeraza 2 U dNTP 100 µM Tris-HCl (pH 8,8) 10 mM MgCl ₂ 2,5 mM KCl 50 mM Nonident P40 0,08% V = 30 µL	predenaturacja: 93°C, 3 min 35 cykli: 93°C, 1 min 38°C, 1 min 72°C, 2 min zakończenie: 72°C, 5 min

Tabela 3

Metodyka RAPD dla drożdży z innych produktów spożywczych

Przedmiot badań Pozycja bibliograficzna	Primer: Sekwencja	Skład mieszaniny reakcyjnej	Warunki kolejnych etapów PCR
1	2	3	4
izolaty z mięsa drobiowego: <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Candida zeylanoides</i> (152 szczepy) Deák i wsp., 2000 (27)	ERIC1R: ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC ERIC2: AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG	primer 200 ng DNA (komórki) 20 µl Taq DNA polimeraza 1 U dNTP 1,2 mM Tris-HCl (pH 8,9) 10 mM MgCl ₂ 1,5 mM KCl 50 mM V = 50 µl	predenaturacja: 94°C, 5 min 40 cykli: 92°C, 45 s 25°C, 1 min 68°C, 10 min
izolaty z kiełbas <i>Y. lipolytica</i> (8 szczepów) Gardini i wsp., 2001 (26)	M13: GAGGGTGGCGGTTCT RF2: CGGCCCTGT	primer 1 µM DNA 80 ng Taq DNA polimeraza 2 U dNTP 200 µM Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 1,5 mM V = 25 µl	35 cykli: 94°C, 1 min 45°C, 20 s 72°C, 2 min predenaturacja: 95°C, 1 min 35 cykli: 95°C, 30 s 36°C, 1 min 72°C, 1 min zakończenie: 72°C, 5 min
izolaty z serów: <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>C. catenulata</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Issatchenkia orientali</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Y. lipolytica</i> (85 szczepów) Prilinger i wsp., 1999 (20)	M13: GAGGGTGGCGGTTCT DEKAMER1: ACGGTCTTGG DEKAMER2: TGCCGAGCTG DEKAMER3: TGCAGCGTGG DEKAMER4: GGGTAACGCC	nie podano	nie podano
izolaty z produktów mlecz- nych: <i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>K. lactis</i> <i>D. hansenii</i> <i>Y. lipolytica</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> (48 szczepów) Andrighetto i wsp., 1999 (19)	M13: GAGGGTGGCGGTTCT RF2:CGGCCCTGT	primer 1 µM DNA 80 ng Taq DNA polimeraza 2 U dNTP 200 µM Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 1,5 mM V = 25 µl	35 cykli: 94°C, 1 min 45°C, 20 s 72°C, 2 min predenaturacja: 95°C, 1 min 35 cykli: 95°C, 30 s 36°C, 1 min 72°C, 1 min zakończenie: 72°C, 5 min

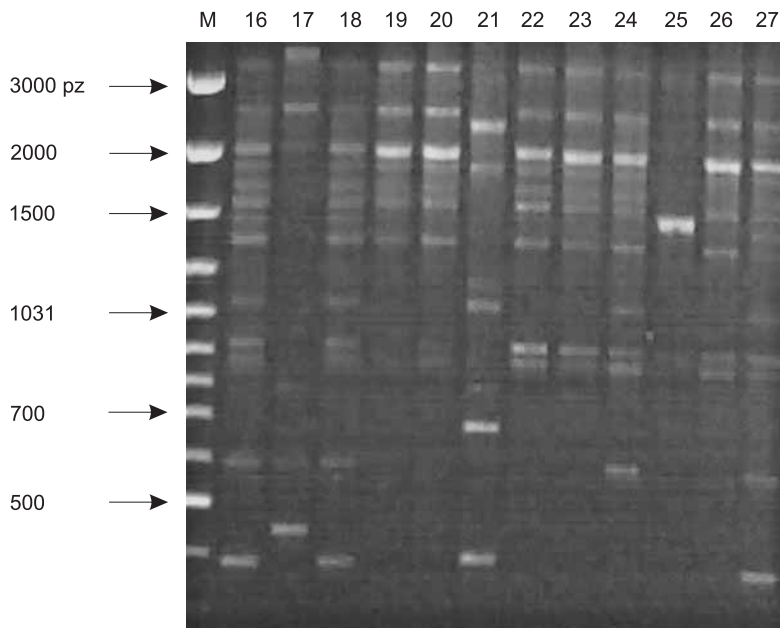
1	2	3	4
izolaty z linii produkcyjnych majonezów oraz sosów do sałatek: <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Pichia</i> , <i>Cryptococcus</i> (126 szczepów)	(GTG) ₅ (GAC) ₅	primer 0,2 μM DNA 0,25 ng Taq DNA polimeraza 1 U dNTP 200 μM Tris-HCl (pH 8,3) 20 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 3 mM żelatyna 0,001%	predenaturacja: 94°C, 5 min 40 cykli: 94°C, 15 s 45°C, 45 s dla (GAC) ₅ 55°C, 45 s dla (GTG) ₅ 72°C, 1 min 30 s zakończenie: 72°C, 1 min 30 s
Baleiras Couto i wsp., 1996 (22)		V = 50 μl	
<i>Aureobasidium pullulans</i> Scheda i wsp., 2002 (28)	OpD-20: ACCCGGTCAC OpC-05: GATGACGGCC OpC-08: TGGACGGGTG	primer 5 μM DNA 100 ng Taq DNA polimeraza 1 U dNTP 100 Tris-HCl (pH 8,8) mM MgCl ₂ 10 mM KCl 2 mM Triton X-100 50 mM 0,1%	predenaturacja: 94°C, 5 min 45 cykli: 94°C, 1 min 36°C, 1 min 72°C, 2 min
		V = 25 μl	

Wśród przemysłowych szczepów browarniczych obserwowano większą różnorodność obrazów elektroforetycznych niż wśród szczepów gorzelnicznych, a najbardziej heterogeniczne profile uzyskano przy zastosowaniu primeru 24. Niemniej jednak, przy użyciu, np. primeru 28, dla większości szczepów stwierdzano prążek wielkości około 1800 pz, którego obecność być może definiuje przynależność do rodzaju.

Z kolei profile elektroforetyczne produktów RAPD otrzymane przy zastosowaniu startera 21 dla szczepów typu „lager” wyróżniały się obecnością pięciu wyraźnych prążków, z których cztery znajdowano również we wszystkich izolatach *S. pastorianus*. W przypadku *S. cerevisiae*, w tym szczepów pochodzących z piw typu „ale”, uzyskano również charakterystyczny profil prążków o zdecydowanie większej różnorodności. Mogłoby to sugerować większe zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe w obrębie szczepów należących do drożdży górnej fermentacji (16).

Wykazano także, z użyciem startera 21, że tylko jeden z 16 szczepów wyizolowanych podczas produkcji piwa jest szczepem produkcyjnym o identycznym profilu jak *S. carlsbergensis* 37 (rys. ścieżka 16, 18 i 27) (18).

Możliwość różnicowania drożdży w obrębie rodzaju *Saccharomyces* przy wykorzystaniu oligonukleotydu OPB-12 potwierdziły wyniki uzyskane przez Gomes i wsp. (14), pokazujące również dużą bioróżnorodność izolatów pochodzenia przemysłowego. RAPD ze starterem OPB-12 z powodzeniem zastosowano do identyfikacji oraz określenia stopnia pokrewieństwa rekombinantów uzyskanych w wyniku fuzji protoplastów dwóch szczepów *S. cerevisiae* (23).



Rys. Rozdział eklektroforetyczny produktów RAPD z primerem 21 dla szczepów wzorcowych i izolatów z dwóch browarów. Ścieżka M – standardy (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder Plus, Fermentas); ścieżka 16, 17, 19, 20 odpowiednio izolaty nr 16, 17, 19, 20; ścieżka 18 – szczep produkcyjny; ścieżka 21 – *S. bayanus* CBS 380; ścieżka 22 – *S. brasiliensis* NCAIM 1223; ścieżka 23 – *S. carlsbergensis* NCAIM 1125; ścieżka 24 – *S. pastorianus* NCAIM 1244; ścieżka 25 – *S. exiguus* CBS 379; ścieżka 26 – *S. cerevisiae* PCM 2130; ścieżka 27 – *S. carlsbergensis* 37 (18).

Z kolei zastosowanie, w dwóch niezależnych ośrodkach, primerów $(GAC)_5$ i $(GTG)_5$ do badania polimorfizmu szczepów *S. cerevisiae* umożliwiło ich podział, odpowiednio na dwie oraz na sześć grup (17,21). Pomimo że w większości przypadków zastosowany primer rozdzielił szczepy *S. cerevisiae* na kilka grup, potwierdzenie prawidłowej ich identyfikacji metodą RAPD wymaga zastosowania kilku różnych starterów. Przykładem mogą być badania przeprowadzone z pięcioma primerami: M13, Dekamer 1, Dekamer 2, Dekamer 3 i Dekamer 4, w których potwierdzono przynależność gatunkową tylko dla pięciu z sześciu izolatów zidentyfikowanych na podstawie testów fenotypowych jako *S. cerevisiae* (20). Prawidłowo zidentyfikowane szczepy *S. cerevisiae* wykazywały podobieństwo do szczepu referencyjnego w 84-94%, a między sobą w 85-100%. Izolat HA 817 – mylnie sklasyfikowany jako *S. cerevisiae* – charakteryzował się 96% podobieństwem do szczepu referencyjnego *S. unisporus* (20).

3. Identyfikacja i różnicowanie izolatów *Hanseniaspora* (*Kloeckera*)

Bujdosó i wsp. (24,25), na podstawie badania polimorfizmu DNA szczepów referencyjnych *Hanseniaspora osmophila*, *H. guilliermondii*, *H. occidentalis*, *H. valbyensis*, *H. uvarum* oraz *H. vineae*, zidentyfikowali i zróżnicowali osiemnaście izolatów zaklasyfikowanych do rodzaju *Hanseniaspora*. Autorzy wykonali analizę metodą RAPD z zastosowaniem czterech różnych primerów: M13, OPA-03, OPA-01 oraz RM13. W przypadku oligonukleotydu M13 otrzymali od trzech do siedmiu prążków. Przykładowo gatunek *H. uvarum* generował trzy prążki o wielkości 396, 690 oraz 1700 pz, a *H. osmophila* cztery: 700, 1220, 1500 i 1900 pz. Wynik otrzymany z primerem OPA-03 także umożliwiał rozdzielenie organizmów na gatunki, a w obrębie gatunku *H. uvarum* nawet na szczepy. Ostatecznie niezależnie od stosowanego primera autorzy uzyskali wyniki pozwalające na rozróżnienie poszczególnych izolatów.

Nie powiodło się natomiast różnicowanie trzydziestu szczepów *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*) na bazie starterów (GAC)₅ i (GTG)₅ (21). Oba oligonukleotydy starterowe dały profile elektroforetyczne identyczne dla wszystkich szczepów. Tak zatem analiza RAPD przeprowadzona z tymi oligonukleotydami okazała się nieprzydatna do wewnątrzgatunkowego różnicowania szczepów *H. uvarum*.

4. Identyfikacja i różnicowanie izolatów innych gatunków drożdży

Techniką RAPD potwierdzono przynależność do gatunków: *Aureobasidium pullulans*, *Candida boidinii*, *C. magnoliae*, *C. pelliculosa*, *C. zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Pichia anomala*, *P. fermentans*, *Torulaspota delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailli* i *Z. bisporus* ponad dwustu izolatów drożdży z serów (19,20), linii produkcyjnej majonezów oraz sosów sałatkowych (22), dwóch linii produkcyjnych kiełbas (26), drobiu (27) oraz owoców (28) (tab. 3). W badaniach tych wykorzystano startery M13 (19,20,26), Dekamer 1, Dekamer 2, Dekamer 3 (20), (GTG)₅ i (GAC)₄ (22), RF2 (19,26), typu ERIC (27) oraz OpD-20, OpC-05, OpC-08 (28). Pozwoliły one nie tylko wskazać odrębność gatunkową badanych szczepów, ale także określić stopień ich pokrewieństwa.

Szczepy *Y. lipolytica* izolowane z produktów mięsnych podzielono na trzy odrębne grupy, bardzo odległe od siebie pod względem podobieństwa (<34%) (26). Izolaty tego gatunku z produktów mlecznych były bardzo podobne (>96%) (20). Otrzymane dendrogramy umożliwiły odróżnienie źródła pochodzenia szczepu (produkty mięsne lub mleczne, typ sera) oraz identyfikację linii produkcyjnej.

Andrighetto i wsp. (19) przedstawili dendrogram składający się z siedmiu ramion. Grupuje on izolaty drożdży według przynależności gatunkowej. Pierwsze ramię dendrogramu zawiera szczepy *K. lactis* (anamorf *Candida sphaerica*), drugie izolaty *K. marxianus* (anamorf *Candida kefir*), a trzecie szczepy *Y. lipolytica*. Czwarte ramię dendrogramu obejmuje cztery niezidentyfikowane izolaty z serów Mozzarella, a pią-

te szczepy *S. cerevisiae*, które w zależności od pochodzenia rozdzielono na dwie subkultury, izolaty z serów Feta i Mozzarella. Ramię szóste składa się tylko z dwóch izolatów *T. delbruecki*, a ostatnie siódme ramię tworzą izolaty *D. hansenii* (anamorf *Candida famata*). Trzy wyizolowane szczepy, w tym jeden zidentyfikowany jako *Pichia farinosa* tworzą indywidualne odgałęzienia drzewka pokrewieństwa.

5. Parametry RAPD-PCR a wyniki różnicowania i identyfikacji drożdży

Z danych przedstawionych w tabelach 1, 2 i 3 wynika, że metodyka RAPD wykorzystana do identyfikacji drożdży była bardzo zróżnicowana. Różnice dotyczyły stosowanych primerów i warunków reakcji amplifikacji, w tym stężenia reagentów, czasu i temperatury przebiegu poszczególnych jej etapów. Odmienne warunki PCR oraz inny skład mieszaniny reakcyjnej zastosowano nawet w analizach przeprowadzonych z udziałem tego samego startera. W wielu innych pracach zwracano uwagę na fakt, że ilość i jakość otrzymanych produktów amplifikacji zależy od metody otrzymania materiału genetycznego, od ilości dodanej matrycy (badane DNA), ilości dNTP czy ilości $MgCl_2$ (4,7,29-34). Zbyt duża ilość DNA powoduje powstanie tak zwanego tła, czyli niespecyficzných produktów reakcji. Zmiana dawki dNTP może wpłynąć na intensywność prążków, a użycie w reakcji amplifikacji buforu o wysokim pH (>9,0) może spowodować, że obraz rozdziału elektroforetycznych produktów PCR będzie mało czytelny. Zaobserwowano również zanikanie prążków w profilach elektroforetycznych pod wpływem wzrastającego stężenia $MgCl_2$ stosowanego w reakcji polimerazy (33).

Bardzo duże znaczenie przy badaniu zróżnicowania drożdży metodą RAPD ma prawidłowy dobór oligonukleotydu starterowego. Wielu badaczy postuluje testowanie większej liczby primerów przed wyborem tego właściwego dla danego mikroorganizmu i stosowanych warunków PCR (10,31). W identyfikacji drożdży *Kloeckera apiculata*, badacze stwierdzili małą skuteczność starterów $(GTG)_5$ i $(GAC)_5$ (21), podczas gdy w przypadku *S. cerevisiae* oba primery generowały czytelne profile elektroforetyczne, niezależnie od źródła pochodzenia szczepów (produkty mleczne, majonezy i sosy do sałatek) (22). Autorzy tego opracowania, otrzymali dla piętnastu szczepów izolowanych z linii produkcyjnej piwa, powtarzalne analizy z dwoma z czterech testowanych starterów, tj. dla $(GTG)_5$ i $(GACA)_4$ (35).

Dyskusji poddano zastosowane przez różnych badaczy parametry RAPD i otrzymane rezultaty różnicowania drożdży. W analizie tej uwzględniono prace dotyczące najczęściej stosowanych primerów: M13, OPB-12, $(GTG)_5$ i $(GAC)_5$.

Primer M13 o sekwencji zaczerpniętej z DNA bakteriofaga M13 (5'GAGGGTGGC-GGTCT3') (2), wykorzystano do amplifikowania genomów drożdży pochodzących z produktów mlecznych (19,20), kiełbas typu salami (26), oraz win otrzymanych w wyniku spontanicznej fermentacji moszczy winogronowych (24,25). Wykorzystano go także w pracy nad izolatami klinicznymi (tab. 4) (2). W czterech z wymienio-

nych pozycji (2,19,24,25) zastosowano identyczną temperaturę podczas pierwszego (denaturacja nici badanego DNA) oraz ostatniego etapu reakcji RAPD (wydłużanie przyłączonych primerów), odpowiednio 94°C i 72°C. Proces annealingu (asocjacja odcinków starterowych do rozpleczonego DNA) w dwóch przypadkach przeprowadzono w 45°C (19,24), a w badaniach dotyczących klinicznych izolatów w 50°C. Bujdosó i wsp. (24,25), oprócz trzech podstawowych etapów RAPD, przeprowadzili trzyminutową predenaturację w temperaturze 94°C oraz dodatkowy siedmiominutowy etap wydłużania w 72°C.

Tabela 4

Metodyka RAPD dla szczepów patogennych

Przedmiot badań Pozycja bibliograficzna	Primer: Sekwencja	Skład mieszaniny reakcyjnej	Warunki kolejnych etapów PCR
<i>Candida albicans</i>	(GTG) ₅	primer 30 ng	35 cykli: 94°C, 20 s 50°C, 1 min 72°C, 20 s zakończenie: 72°C, 6 min
<i>C. krusei</i>		DNA 25 ng	
<i>C. parapsilosis</i>	(GACA) ₃	Taq DNA polimeraza 2,5 U	
<i>C. glabrata</i>		dNTP 0,2 mM	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	M13: GAGGGTGGCGGTTCT	Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM	
<i>Cryptococcus curvatus</i>		KCl 50 mM MgCl ₂ 1,5 mM	
Latouche i wsp., 1997 (2)		v = 50 µl	

W każdym z analizowanych protokołów badań zastosowano inny czas prowadzenia poszczególnych etapów reakcji. Tak zatem, czas trwania procesu denaturacji zawierał się w granicach od dwudziestu sekund dla rodzaju *Candida* (2) do jednej minuty dla izolatów pochodzących z produktów mlecznych (19). Annealing prowadzono najdłużej, przez 80 sekund, w przypadku drożdży *Hanseniaspora* (24,25), podczas gdy dla szczepów pochodzących z produktów mlecznych tylko przez 20 sekund (19). Największe różnice dotyczyły etapu wydłużania nici DNA: od dwudziestu sekund (2) do dwóch minut i dwudziestu sekund (24,25).

Liczba cykli reakcji zastosowanych do amplifikacji próbek DNA wynosiła trzydzieści pięć (2,19) lub czterdzieści (24,25).

Odnotowano także duże zróżnicowanie składu mieszaniny reakcyjnej, zwłaszcza pod względem ilości badanego DNA i dodanej polimerazy. Poszczególne mieszaniny reakcyjne zawierały następujące porcje materiału genetycznego: 25 ng, dla szczepów klinicznych (2); 50 ng, dla izolatów z win (24,25); a nawet 80 ng, w przypadku drożdży pochodzenia mleczarskiego (19). Najmniejszą ilość polimerazy (2 U) stosowali Andrighetto i wsp. (19), choć badane przez nich próby zawierały najwięcej DNA. Natomiast ilość dodanego primera była podobna w cytowanych opracowaniach (21-30 ng).

W celu sprawdzenia zgodności wyników uzyskanych przez poszczególnych badaczy z odcinkiem starterowym M13, porównano profile elektroforetyczne otrzymane dla izolatów *S. cerevisiae* i *Y. lipolytica* z produktów mlecznych (19) oraz materiałów klinicznych (2).

Dla wszystkich badanych szczepów *S. cerevisiae* (dwa izolaty kliniczne i piętnaście izolatów mleczarskich) stwierdzono obecność trzech jednakowych produktów amplifikacji o wielkości około 700, 750 i 1100 pz. Obrazy produktów amplifikacji RAPD dla poszczególnych szczepów wykazały dodatkowe prążki powyżej i poniżej charakterystycznych wspólnych pasm. Podobnie dla siedmiu izolatów *Y. lipolytica* z produktów mlecznych (19) oraz jednego szczepu klinicznego (2), zaobserwowano po cztery prążki zawierające około 1500, 1700, 2000 i 2100 pz, oraz po kilka różnych, dodatkowych prążków o mniejszej masie.

Charakterystyczne produkty amplifikacji wykazano również w badaniach RAPD z primerem M13 dla szczepów z gatunku *H. uvarum* oraz *H. osmophila* (24,25). Otrzymano fragmenty o wielkości 370, 690 i 1700 pz dla *H. uvarum* i 700, 1220, 1500 i 1900 pz dla *H. osmophila*.

Zatem w analizie RAPD z primerem M13 otrzymano produkty charakterystyczne dla poszczególnych gatunków, a różnice wykazane pomiędzy szczepami jednego gatunku, mogą wynikać z odmiennego źródła ich izolacji i obrazować polimorfizm szczepów.

Drugi **oligonukleotyd OPB-12** o sekwencji $-5'CCTTGACGCA3'$ jest syntetycznym primerem, który został wykorzystany do różnicowania produkcyjnych oraz dzikich drożdży w browarnictwie i gorzelnictwie (14), a także do różnicowania szczepów rodzicielskich, somatycznych hybrydów oraz segregantów *S. cerevisiae* (23). W obu pracach, oprócz podstawowych trzech etapów reakcji PCR, zastosowano etap dodatkowego dogrzewania otrzymanych produktów, a w drugiej z nich zastosowano również etap predenaturacji DNA przed rozpoczęciem właściwej reakcji amplifikacji. Zasadnicze etapy PCR przebiegały w tych samych temperaturach, przez ten sam czas i w tej samej objętości. Różnice dotyczyły składu mieszaniny reakcyjnej, w tym stężenia KCl oraz ilości startera. Martins i wsp. (23) do przeprowadzenia RAPD zastosowali roztwór o stężeniu 4,5 mM, natomiast Gomes i wsp. (14) ponad dziesięciokrotnie bardziej stężony (50 mM). Jeżeli chodzi o ilość primera to badacze ci zastosowali, odpowiednio, 63,5 ng i 30 ng startera.

Pomimo zastosowania innych stężeń reagentów w reakcji RAPD, w obu pracach wykazano zróżnicowanie badanych szczepów i możliwa była ich identyfikacja.

Pozostałe dwa oligonukleotydy, o sekwencji $(GTG)_5$ oraz $(GAC)_5$ umożliwiają detekcję sekwencji mikrosatelitarnych, czyli sekwencji tandemowo powtarzających się w genomie wielu organizmów (6,36). Występują one także u drożdży (37,38, Saccharomyces Genome Database). Primery te stosowano w badaniach izolatów drożdży pochodzących z win Aglianico (21), drożdży zanieczyszczających wina i piwa (17) oraz majonezy i sosy sałatkowe (22). W wymienionych pracach stosowano identyczne składniki mieszanin reakcyjnych i warunki prowadzenia reakcji, wykazując

zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe izolatów *S. cerevisiae*, *C. boidinii*, *C. pelliculosa*, *C. magnoliae*, *Z. bailli* i *Z. bisporus*.

6. Podsumowanie

Wśród molekularnych metod identyfikacji drożdży, RAPD jest techniką najprostszą. W metodzie tej nie jest potrzebna znajomość chociażby fragmentu sekwencji nukleotydowej genomu badanego organizmu. Jest to dużą jej zaletą, ponieważ umożliwia różnicowanie niezidentyfikowanych izolatów. Odpowiednio zaprojektowana, pozwala na różnicowanie drożdży zarówno na poziomie gatunku jak i podgatunku, a w wielu przypadkach na określenie źródła pochodzenia szczepów (16,19,26). Natomiast, nie udało się za pomocą metody RAPD, różnicowanie form telomorficzyńnych i anamorficzyńnych u drożdży doskonałych (19).

Jakkolwiek w przeważającej liczbie przypadków zastosowanie jednego startera, np. M13 czy (GTG)₅, umożliwia identyfikację drożdży, bezpieczniej jest opierać się na wynikach analiz otrzymanych z udziałem przynajmniej dwóch starterów.

W przypadku monitorowania czystości mikrobiologicznej procesu fermentacyjnego konieczne jest równoczesne badanie szczepu produkcyjnego (wzorca). Każde odstępstwo profilu elektroforetycznego badanej próby od wzorca będzie świadczyło o mikrobiologicznym skażeniu środowiska. Materiałem wzorcowym może być też kultura, zinaktywowana przez sterylizację lub samo DNA, co gwarantuje producentowi ochronę szczepu przemysłowego.

Dyskusyjna jest natomiast, zgodność wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach. Dlatego wielu badaczy postuluje stosowanie jednakowych ilości składników mieszaniny reakcyjnej RAPD oraz zdefiniowanie standardów dla poszczególnych reagentów i parametrów reakcji amplifikacji (30-32,38). Także powszechne wykorzystanie dostępnych gotowych zestawów do PCR (zawierających wszystkie odczynniki oprócz matrycy i primerów), o gwarantowanej przez producenta powtarzalnej jakości, może wyeliminować błędy związane z przygotowaniem i dozowaniem poszczególnych składników. Na powtarzalność uzyskiwanych wyników ma też wpływ wykorzystywana aparatura. Stosowane typy termocyklerów, różnią się sprawnością kontroli temperatury i czasu wyznaczonego dla kolejnych etapów reakcji. Wszystko to utrudnia porównanie wyników otrzymanych w różnych ośrodkach, chociaż wyniki przytoczone dla klinicznych i mleczarskich szczepów *S. cerevisiae* i *Y. lipolytica* wskazują na obecność charakterystycznych dla tych gatunków produktów amplifikacji. Niemniej jednak, ujednoczenie metodyki RAPD umożliwiłoby porównanie wyników otrzymanych w różnych ośrodkach badawczych i mogłoby stać się podstawą do stworzenia uniwersalnych baz danych zawierających profile elektroforetyczne znanych drożdży. W obrębie jednego laboratorium, stosującego jednakową metodykę RAPD, te same odczynniki (polimeraza, primery, nukleotydy) oraz tę samą aparaturę (termocyklery, aparaty do elektroforezy) możliwe jest utworzenie bazy danych mo-

deli elektroforetycznego rozdzielu produktów jako wzorców do przyszłej identyfikacji nieznanymi szczepów.

Literatura

1. Guarro J., Gene J., Stchigel A. M., (1999), *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(3), 454-500.
2. Latouche G. N., Daniel H. M., Ok Cha Lee, Mitchel T. G., Sorrell T. C., Meyer W., (1997), *J. Clin. Microbiol.*, 35(12), 3171-3180.
3. Babalola O. O., (2003), *J. Biotechnol.*, 2 (12), 710-713.
4. López-Ribot J. L., McAtee R. K., Kirkpatrick W. R., Perea S., Patterson T. F., (2000), *Rev. Iberoam. Miccol.*, 17, 49-54.
5. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., (1986), *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol. 1.1.
6. Williams J. G. K., Kubelic A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S., (1990), *Nucl. Acid. Res.*, 18, (22), 6531-6535.
7. Hilton A. C., Banks J. G., Penn C. W., (1997), *Lett. App. Microbiol.*, 24, 243-248.
8. Hopkins K. L., Hilton A. C., (2001), *Lett. Appl. Microbiol.*, 32, 126-130.
9. C-H., Waddingdon M., Greenberg D., Schreckenberger P. C., Carnahan A. M., (2000), *Emerg. Infect. Dis.*, 6(5), 481-486.
10. Gente S., Desmasure N., Panoff J.-M., Gueguen M., (2002), *J. Appl. Microbiol.*, 92, 491-501.
11. Marcellino N., Beuvier E., Grappin R., Gueguen M., Benson D. R., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10), 4752-4759.
12. Stark-Urnau M., Seidel M., Kast W. K., Gemrich A. R., (2000), *Vitis*, 39(4), 163-166.
13. Benecke M., (1998), *Forensic Science Int.*, 98, 157-168.
14. Gomes L. H., Duarte K. M. R., Argueso J. L., Echeverrigaray S., Tavares F. C. A., (2000), *Food Microbiol.*, 17, 217-223.
15. Xufre A., Simoes F., Girio F., Clemente A., Amaral-Collaco M. T., (2000), *Food Technol. Biotechnol.*, 38, 53-58.
16. Tornai-Lehoczi J., Dlačny D., (2000), *Food Microbiol.*, 62, 37-45.
17. Baleiras Couto M. M., Eijmsa B., Hofstra H., Veld J. H. J., van der Vossen J. M. B. M., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 13, 41-46.
18. Barszczewski W., Robak M., (2004), *Food Microbiology*, 21, 227-231.
19. Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A, (2000), *Lett. Appl. Microbiol.*, 30, 5-9.
20. Prillinger H., Molnaar O., Eliskases-Lechner F., Lopandic K., (1999), *Ant. van Leeuwenhoek*, 75, 267-283.
21. Caruso M., Capece A., Salzano G., Romano P., (2002), *Lett. Appl. Microbiol.*, 34, 323-328.
22. Baleiras Couto M. M., Hartog J., Huis in 't Velt J. H. J., Hofstra H., van der Vossen J. B. M., (1997), *Food Microbiol.*, 13, 59-67.
23. Martins C. V. B., Horii J., Pizzirani-Kleiner A., (1999), *Rev. Microbiol.*, 30, 71-76.
24. Bujdosó G., Egli C. M., Henick-Kling T., (2001a), *Food Technol. Biotechnol.*, 39(1), 19-28.
25. Bujdosó G., Egli C. M., Henick-Kling T., (2001b), *Food Technol. Biotechnol.*, 39(2), 83-91.
26. Gardini F., Suzzi G., Lombardi A., Galgano F., Crudele M. A., Andrighetto C., Schirone M., Tofalo R., (2001), *FEMS Yeasts Research*, 1, 161-167.
27. Deák T., Chen J., Beuchat L. R., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4340-4344.
28. Schena L., Sialer M. F., Gallitelli D., (2002), *Plant Dis.*, 86, 54-60.
29. Richard G., Hennequin F. C., Dujon A. T. B., (1999), *Res. Microbiol.*, 150, 589-602.
30. Meunier J.-R., Grimont P. A. D., (1993), *Res. Microbiol.*, 144, 373-379.
31. Tyler K. D., Wang G., Tyler S. D., Johnson W. M., (1997), *J. Clin. Microbiol.*, 35(2), 339-346.
32. Kloosterman A. D., (2001), *Accred. Qual. Assur.*, 6, 409-414.

33. Sansinforiano M. E., Rabasco A., Martinez-Trancon M., Parejo J. C., de Mendoza M. H., Padilla J. A., (2001), *Rev. Iberoam. Micol.*, 18, 65-69.
34. Lockhart S. R., Joly S., Pujol C., Sobel J. D., Pfaller M. A., Soll D. R., (1997), *Microbiol.*, 143, 3733-3746.
35. Barszczewski W., Robak M., Wojtatowicz M., (2004), *Mat. XXVI Zjazdu PTTŻ nt. „Żywność, aspekty technologiczne i prozdrowotne”*, Łódź, (22-24 wrzesień), 62.
36. Debrauwere H., Gendrel C. G., Lechat S., Dutreix M., (1997), *Biochimie*, 79, 577-586.
37. Richard G. F., Dujon B., (1997), *Res. Microbiol.*, 148, 731-744.
38. Micheli M. R., Bova R., Pascale E., D'Ambrosio E., (1994), *Method. Nucl. Acid. Res.*, 22, (10), 1921-1922.