

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 138 (1996)

Heft: 3

Artikel: "Arbitrarily primed-PCR", oder: Der Zufall im Dienst der Forschung

Autor: Felleisen, R. / Gottstein, B.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-590531>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 12.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

«Arbitrarily primed-PCR». Oder: Der Zufall im Dienst der Forschung

R. Felleisen und B. Gottstein

Zusammenfassung

Die sogenannten AP-PCR (*arbitrarily primed-PCR*)-Methoden beruhen auf der Amplifikation von DNA mit willkürlich ausgewählten *primers*. Im vorliegenden Übersichtsartikel werden zwei ausgewählte Anwendungen dieses methodischen Ansatzes vorgestellt. Die sogenannte RAPD-Technik (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) erlaubt eine Analyse der genetischen Variabilität von Organismen mit Hilfe eines genetischen Fingerabdrucks. Durch dieses Verfahren wurde die molekular-epidemiologische Situation hinsichtlich des Parasiten *Echinococcus granulosus* in Spanien und der Schweiz vergleichend charakterisiert. Folgende Gruppen genetisch verwandter Isolate konnten definiert werden: (a) Isolate von Equiden (Pferd/Esel) aus Spanien und der Schweiz, (b) Isolate von Rindern aus der Schweiz, (c) Isolate von Ziegen aus Spanien und Isolate von Schweinen aus beiden Ländern, (d) Isolate aus Schaf und Rind aus Spanien und Isolate aus Humanpatienten aus Spanien. Weiterhin bildeten bezüglich ihrer genetischen Verwandtschaft Isolate aus Schweizer Patienten eine eigene Gruppe.

Als weitere Anwendung der AP-PCR wird die Entwicklung einer neuen Methode zur Herstellung von cDNA-Banken aus geringsten Mengen von Ausgangsmaterial am Beispiel einer *Echinococcus multilocularis* Metazestoden-Bank präsentiert.

Schlüsselwörter: AP-PCR – RAPD – *Echinococcus* – cDNA-Bank

«Arbitrarily primed PCR»: research benefits from arbitrariness

«Arbitrarily primed PCR» (AP-PCR) methods are based on the amplification of DNA with arbitrarily selected primers. In the present review article two selected applications of this methodical approach are summarized. Using the RAPD (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) technique the genetic variability of different organisms can be analyzed by generating a genomic fingerprint. *Echinococcus granulosus* isolates (metacestodes) from Spain and Switzerland were comparatively characterized by the use of this molecular epidemiological tool. The following groups of genetically related isolates could be identified: (a) equine isolates (horse/donkey) from Spain and Switzerland, (b) cattle isolates from Switzerland, (c) goat isolates from Spain and pig isolates from both countries, (d) sheep, cattle and human isolates from Spain. Isolates derived from Swiss patients were forming a separate group with respect to their genetic relatedness.

As a further application of the AP-PCR, the development of a novel technique for the construction of cDNA libraries from minute amounts of starting material using an *Echinococcus multilocularis* metacestode library as an example is presented.

Key words: AP-PCR – RAPD – *Echinococcus* – cDNA library

Einleitung

Die meisten Anwendungen der Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) beruhen auf der Amplifikation von DNA-Sequenzen mit gezielt ausgewählten, genau definierten *primers*, die von der zu amplifizierenden Sequenz direkt abgeleitet sind. Für bestimmte Fragestellungen kommt jedoch eine als «arbitrarily primed-PCR» (AP-PCR) bezeichnete Methode zum Einsatz, bei der die *primers*

willkürlich, d.h. ohne vorliegende Sequenzinformation ausgewählt und in der PCR eingesetzt werden.

Im folgenden werden zwei Methoden der AP-PCR vorgestellt, die von uns zum einen zur Analyse der genetischen Variabilität von Parasiten, zum anderen zur Herstellung von cDNA-Banken aus geringsten Mengen von Ausgangsmaterial verwendet werden. Eine weitere Anwendung, die hier nicht dargestellt werden kann, das sogenannte «differential display», sei nur zur Vollständigkeit erwähnt.

mindestens 50% gilt als Faustregel. Da nur ein *primer* für die Amplifikation verwendet wird, muss die entsprechende Sequenz in der genomischen DNA mindestens zweimal, d.h. einmal im plus- und einmal im minus-Strang, vorhanden sein, um ein Amplifikationsprodukt liefern zu können. Zusätzlich darf der Abstand dieser beiden Sequenzen nicht zu gross sein, damit noch eine effiziente Amplifikation erfolgen kann. Viele *primers* ergeben deshalb keine Amplifikationsprodukte, bei den meisten anderen ist die Zahl der PCR-Produkte pro individuellem *primer* auf wenige limitiert. Analysiert man diese dann auf einem Gel, ergibt jeder *primer* ein charakteristisches Bandenmuster (siehe auch Abbildung 1). Zwei genetisch identische bzw. eng verwandte Individuen, Stämme oder Spezies liefern mit verschiedenen *primers* jeweils ein identisches Bandenmuster. Bei genetisch unterschiedlichen Organismen kann sich jedoch das Muster unterscheiden. PCR-Reaktionen mit mehreren willkürlich ausgewählten *primers* erzeugen deshalb einen «genetischen Fingerabdruck», der für den jeweiligen Organismus (Stamm, Spezies) charakteristisch ist und zu dessen Identifizierung und Abgrenzung zu anderen Organismen (Stämmen, Spezies) verwendet werden kann.

Die Vorteile dieser relativ einfachen Methode liegen auf der Hand: Sie liefert, sobald geeignete *primers* identifiziert wurden, im Vergleich zur klassischen Southern-Hybridisierungs-Analyse ein schnelles Resultat, ohne dass hierfür irgendwelche Sequenzinformationen über die zu vergleichenden Organismen bekannt sein müssen. Die benötigte Probenmenge ist sehr gering, so genügen z. B. 25 ng genomischer DNA von Parasiten pro Reaktion für eine vergleichende Analyse. Dieses genomische Material muss allerdings möglichst rein und frei von genomischer DNA des Wirtes sein, um die Amplifikation von Wirts-DNA zu vermeiden, welche zu einer Verfälschung des Bandenmusters führen würde.

Mit Hilfe der RAPD-Methode gelang es uns, verschiedene Isolate von *E. granulosus* (Metazestoden) aus Spanien und der Schweiz aufgrund ihrer charakteristischen Bandenmuster hinsichtlich ihrer genetischen Verwandtschaft zu gruppieren (Siles-Lucas et al., 1994; Abbildungen 2 und 3): (a) Isolate von Equiden (Pferd/Esel) aus Spanien und der Schweiz, (b) Isolate von Rindern aus der Schweiz, (c) Isolate von Ziegen aus Spanien, und Isolate von Schweinen aus beiden Ländern, (d) Isolate von Schaf und Rind aus Spanien; von diesem sogenannten «domestic sheep strain» sind hauptsächlich Schafe als Zwischenwirt betroffen, aber die Entwicklung von Metazestoden kann auch in Rindern und Schweinen erfolgen, allerdings in geringerem Ausmass (Thompson und Lymbery, 1988). Isolate aus Humanpatienten aus Spanien wiesen ebenfalls dieses Bandenmuster auf, was andeutet, dass sich in Spanien der Mensch offensichtlich bevorzugt mit dem Schaf-Stamm infiziert.

Nach bisherigem epidemiologischem Kenntnisstand wurde angenommen, dass sich Schweizer Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit in Mittelmeerländern ebenfalls mit diesem Stamm, oder direkt in der Schweiz mit

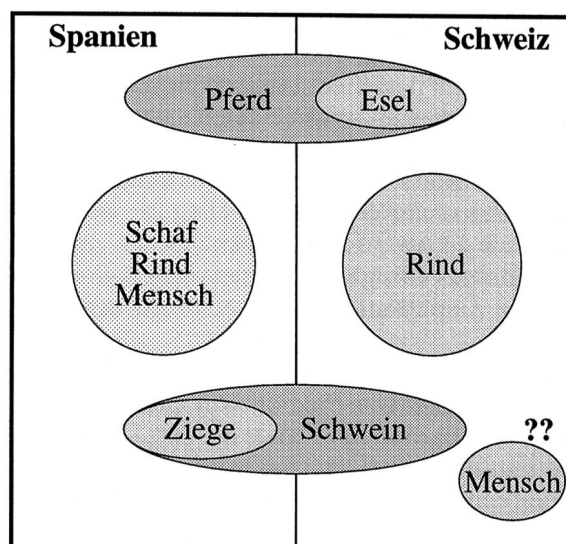


Abbildung 3: Schematische Darstellung der genetischen Verwandtschaft verschiedener *E. granulosus*-Isolate in Spanien und der Schweiz. Isolate aus Humanpatienten aus der Schweiz konnten keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden.

dem dortigen Rinder-Stamm infiziert haben könnten. Die wenigen Isolate aus Humanpatienten aus der Schweiz, welche wir mit dieser Methode untersuchen konnten, wiesen jedoch überraschenderweise ein Bandenmuster auf, das sich deutlich von dem aller anderen Stämme unterschied. Möglicherweise könnte dies auf Infektion mit einem anderen *E. granulosus*-Stamm (z. B. Kamel-Stamm) hindeuten, der nicht in dieser Studie analysiert wurde. Andererseits könnten methodische Schwierigkeiten des RAPD-Verfahrens die Ursache für dieses Phänomen sein. So kann unter Umständen eine artifizielle Variabilität der Bandenmuster bei der RAPD-PCR in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis des *primers* zur *template*-DNA, von der *annealing*-Temperatur während der Amplifikation und von der Magnesium-Konzentration im Ansatz auftreten (Ellsworth et al., 1993; Meunier und Grimont, 1993). Weitere Untersuchungen wären deshalb erforderlich, um die epidemiologische Situation von *E. granulosus* in der Schweiz noch klarer zu definieren.

Ein alternativer Ansatz zur Etablierung von cDNA-Banken mit Hilfe der AP-PCR

Expressionsbanken von verschiedenen Parasitenstadien repräsentieren ein wertvolles Werkzeug bei der Analyse stadienspezifischer Genexpression und der Identifizierung der entsprechenden Moleküle. Die Charakterisierung der biologischen Funktion der stadienspezifisch exprimierten Genprodukte könnte zum Beispiel Einblicke in die Wirt/Parasit-Interaktion auf molekularer Ebene im Hinblick auf immun-modulatorische Substanzen ermög-

lichen und eine Analyse ihres antigenen Potentials ihren Wert als diagnostische Antigene oder als potentielle Vakzine-Kandidaten beleuchten. Die Isolierung von Parasitenmaterial in Mengen, welche für RNA-Aufreinigung und Konstruktion von cDNA-Banken mit klassischen Methoden ausreichend sind, ist jedoch nicht möglich, wenn das Parasitenstadium von Interesse nicht *in vitro* kultiviert oder nur schwer aus natürlichen Quellen gereinigt werden kann. Als einzige Alternative muss hier auf die PCR für die Amplifikation der cDNA zurückgegriffen werden.

Verschiedene ausgefeilte Methoden wurden bereits für die PCR-vermittelte Konstruktion von Genbanken beschrieben, bei denen an das 5'-Ende der cDNA sogenannte Ankersequenzen angehängt werden. Die Amplifikation erfolgt dann mit zwei *primers*, die zum einen dieser 5'-Ankersequenz, zum anderen dem poly-A-Schwanz am 3'-Ende komplementär sind. Den limitierenden Schritt bei diesen Verfahren stellt das Anhängen der *primer*-Se-

quenzen am 5'-Ende dar, das unter Umständen nur ineffizient durchgeführt werden kann und schwierig zu reproduzieren ist. Wir haben deshalb versucht, eine einfachere, alternative Methode zu entwickeln.

Dazu haben wir durch PCR eine cDNA-Bank ausgehend von ca. 80 ng Gesamt-RNA des *Echinococcus multilocularis*-Metazestodenstadiums hergestellt (Felleisen und Gottstein, 1995). Für den klassischen Ansatz wäre normalerweise ungefähr die tausendfache Menge erforderlich! Die mRNAs wurden in einzelsträngige cDNA-Moleküle überschrieben (reverse Transkription) und anschliessend durch PCR amplifiziert, und zwar mit (a) einem poly-dT Anker-*primer*, welcher zusätzlich die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym beinhaltet, um die anschliessende Klonierung zu erleichtern, und (b) mit einem Gemisch von 17 verschiedenen, zufällig ausgewählten 10mer-*primers* (Abbildung 4). Zugrunde lagen folgende Überlegungen: Die Gesamtzahl aller verschiedener mRNA-Sequenzen, die in einer bestimmten Zelle transkribiert werden, wird auf ca. 12 000 geschätzt, wobei die individuellen mRNAs in ganz unterschiedlichen Kopienzahlen vorliegen (Hastie und Bishop, 1976). Als durchschnittliche Grösse nimmt man für mRNAs ca. 1200 Nukleotide an. Das Gesamtrepertoire der Transkripte einer Zelle umfasst demnach ca. $1,5 \times 10^7$ verschiedene Nukleotide. Die Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Oligonukleotid in dieser Gesamtheit hybridisieren kann, ist hauptsächlich von seiner Länge abhängig: Je kürzer es ist, desto häufiger findet es einen entsprechenden Partner. So sollten zum Beispiel rein statistisch nur ein 5mer oder zehn 7mere in der Lage sein, alle 12 000 verschiedenen Transkripte zu erkennen. Die PCR-Amplifikation aller verschiedenen cDNAs sollte deshalb theoretisch mit Hilfe von einem Gemisch von zehn 7meren und einem *primer*, der komplementär zum poly-A-Schwanz ist, möglich sein. Tatsächlich erwiesen sich jedoch 10mer-*primers* als geeigneter: Sie verhielten sich, was die Kapazität für das *priming* anbelangt, wie 7mere, das heisst, sie erkannten wesentlich mehr verschiedene cDNA Moleküle als vorhergesagt, vermutlich aufgrund der Tatsache, dass *mismatches*, Falschpaarungen, am 5'-Ende der *primers* unter den verwendeten PCR-Bedingungen toleriert werden. Kürzere *primers* dagegen waren absolut ungeeignet.

Das aus der PCR resultierende cDNA-Gemisch (Abbildung 5) wurde dann mit sogenannten Adaptoren (kurzen DNA-Stücken, welche die Klonierung erleichtern) versehen und gerichtet in dem Phagen-Vektor λ ZAPII kloniert (siehe auch Abbildung 4). Die Ausbeute betrug am Ende ca. 3×10^5 rekombinante Phagenklone.

Um die theoretischen Überlegungen zu verifizieren und unseren experimentellen Ansatz zu validieren, haben wir anschliessend diese cDNA-Bank mit verschiedenen Sonden analysiert. Unter anderem haben wir hierfür das sehr gut von uns untersuchte Metazestoden-Antigen II/3 (Felleisen & Gottstein, 1993; 1994) benutzt, da in der Sequenz von II/3 keine der verwendeten *primer*-Sequenzen mit absolut 100%iger Übereinstimmung vorkommen. Sollten dennoch von II/3 abgeleitete Klone in

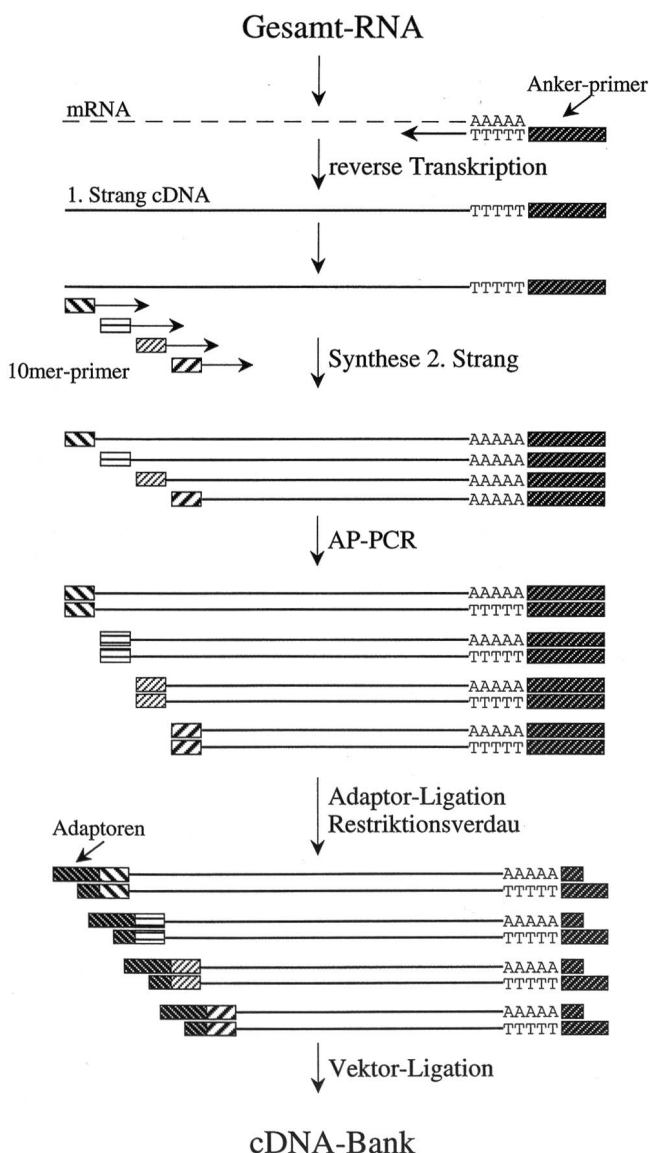


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Methode zur Konstruktion von cDNA-Banken mit Hilfe der AP-PCR.

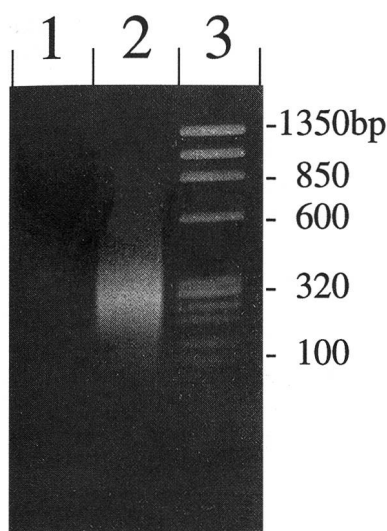


Abbildung 5: Analyse der Amplifikationsprodukte der AP-PCR. Da eine Vielzahl verschiedener cDNA-Moleküle amplifiziert wurde, ergibt sich ein breiter «Schmier». (1) = negative Kontrolle ohne DNA; (2) = amplifizierte cDNA-Fragmente; (3) = Molekulargewichtsmarker.

der Bank zu finden sein, wäre unsere Hypothese von den Falschpaarungen bestätigt. Tatsächlich fanden wir sowohl mit II/3-Gensonden als auch mit polyklonalen anti-II/3 Antikörpern entsprechende Klone in der cDNA-Bank. Die Sequenz-analyse dieser Klone ergab 3 bzw. 4 Abweichungen von der II/3-Sequenz unmittelbar am 5'-Ende, die offensichtlich durch Falschpaarung der *primers* zustande gekommen waren.

Nach der erfolgreichen Etablierung dieser Methode mit Metazestoden-RNA, einem weniger «wertvollen», da in grösseren Mengen verfügbaren Material, haben wir sie inzwischen auf die Konstruktion einer cDNA-Bank aus ca. 1000 aktivierten *E.multilocularis*-Onkosphären angewandt, einem Stadium des Parasiten, welches nur in äusserst geringen Mengen durch *in vitro*-Kultivierung von Adulten und anschliessender Aktivierung von *in vitro*-produzierten Eiern gewonnen werden kann. Diese cDNA-Bank wird zur Zeit mit molekularbiologischen und immunologischen Methoden untersucht. Allgemein könnte dieses Verfahren für alle Anwendungen, bei welchen das Ausgangsmaterial den limitierenden Faktor darstellt, von Nutzen sein.

Schlussbemerkung

Die beiden von uns dargestellten Beispiele demonstrieren die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten der PCR

ausser der gerichteten Amplifikation einer genau definierten Zielsequenz. Zahlreiche neue Methoden wurden bereits und werden sicher noch entwickelt, um komplexe biologische Fragestellungen, wie sie z.B. die Amplifikation des gesamten cDNA-Repertoires eines Organismus darstellt, angehen zu können. Die Möglichkeiten sind sicher noch nicht ausgeschöpft, und selbst der Zufall, der bei der Auswahl der *primers* bei der AP-PCR mitspielt, findet seinen Platz in der veterinärmedizinischen Forschung.

Literatur

- Eckert J., Thompson R.C.A. (1988): *Echinococcus* strains in Europe: a review. Trop. Med. Parasitol. 39, 1-8.
- Eckert J., Thompson R.C.A., Lymbery A.J., Pawlowski Z.S. Gottstein B., Morgan U.M. (1993): Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. Parasitol. Res. 79, 42-48.
- Ellsworth D.L., Rittenhouse K.D., Honeycutt R.L. (1993): Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. BioTechniques 14, 214-216.
- Felleisen R., Gottstein B. (1993): *Echinococcus multilocularis*: molecular and immunochemical characterization of diagnostic antigen II/3-10. Parasitol. 107, 335-342.
- Felleisen R., Gottstein B. (1994): Comparative analysis of full-length antigen II/3 from *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus*. Parasitol. 109, 223-232.
- Felleisen R., Gottstein B. (1995): An alternative approach for the construction of parasite cDNA libraries from low amounts of RNA. Experientia 51, A86.
- Hastie N.D., Bishop J.O. (1976): The expression of three abundance classes of mRNA in mouse tissues. Cell 9, 761-774.
- Meunier J.R., Grimont P.A.D. (1993): Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Res. Microbiol. 144, 373-379.
- Siles-Lucas M., Felleisen R., Cuesta-Bandera C., Gottstein B., Eckert J. (1994): Comparative genetic analysis of Swiss and Spanish isolates of *Echinococcus granulosus* by Southern hybridization and Random Amplified Polymorphic DNA technique. Appl. Parasitol. 35, 107-117.
- Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (1988): The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. Adv. Parasitol. 27, 209-258.
- Thompson R.C.A., Lymbery A.J., Constantine C.C. (1995): Variation in *Echinococcus*: Towards a taxonomic revision of the genus. Adv. Parasitol. 35, 146-175.
- Vogel M., Müller N., Gottstein B., Flury K., Eckert J., Seebeck T. (1991): *Echinococcus multilocularis*: Characterization of a DNA probe. Acta Trop. 48, 109-116.
- Williams J.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 Res. 18, 6531-6535.
- Welsb J., McClelland M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18, 7213-7218.

Korrespondenzadresse: Dr. Richard Felleisen, Institut für Parasitologie, Universität Bern, Länggass-Strasse 122, CH-3012 Bern