

# WPŁYW WARUNKÓW IZOLACJI DNA NA CZUŁOŚĆ TESTU MOLEKULARNEGO W DIAGNOSTYCE SPRAWCY BAKTERIOZY PIERŚCIENIOWEJ ZIEMNIAKA

*mgr inż. Katarzyna Salamońska, dr inż. Włodzimierz Przewodowski*  
*IHAR-PIB, Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii*  
*e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl*

**D**iagnostyka molekularna kwarantannowych bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) – sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, bardzo często jest utrudniona z powodu różnego rodzaju substancji i zanieczyszczeń znajdujących się w próbach pobranych bezpośrednio ze środowiska. Prawidłowy wynik testu molekularnego mogą zakłócać m.in. takie komponenty jak egzonukleazy, polisacharydy, polifenole oraz inhibitory proteaz, które są powszechne w tkankach roślinnych i swoją obecnością mogą hamować działanie enzymów odpowiedzialnych za prawidłowe przeprowadzenie testu PCR. W celu wyeliminowania niechcianych komponentów należy dobrać odpowiednią metodę, pozwalającą na pozbycie się tego rodzaju substancji podczas izolacji kwasów nukleinowych. Jest to etap kluczowy dla dalszej identyfikacji, ponieważ czystość i ilość wyizolowanego DNA ma wpływ na uzyskanie prawidłowego wyniku testu PCR.

Wydajną izolację kwasów nukleinowych gram dodatnich bakterii Cms może utrudnić także ich ściana komórkowa. Jest ona zbudowana z wielu warstw peptydoglikanu – polimeru, który ma za zadanie chronić komórkę bakterii przed uszkodzeniami mechanicznymi i czynnikami zewnętrznymi. Aby ułatwić proces izolacji DNA bakterii, należy dobrać odpowiednią metodę dezintegracji ścian komórek. Do bardzo skutecznych sposobów należy trawienie enzymatyczne, w którym stosuje się enzymy rozkładające wiązania obecne w ścianie komórkowej bakterii gram-dodatnich.

Dlatego za cel prezentowanej pracy przyjęto porównanie różnych sposobów izolacji kwasów nukleinowych w obecności enzymów mających za zadanie dezintegrację ściany komórek bakterii Cms i wybór najefektywniejszego wariantu.

Do doświadczeń użyto świeżo sporządzonych zawiesin mukoidalnego szczepu Cms w dwóch mediach – sterylnej wodzie oraz ekstrakcie roślinnym. Do izolacji DNA stosowano trzy różne sposoby izolacji kwasów nukleinowych, odpowiednio z użyciem wysokich stężeń soli, detergentu jonowego CTAB oraz metody zalecanej przez Europejską i Śródziemnomorską Organizację Ochrony Roślin (EPPO). W każdej z metod stosowano cztery różne warianty z enzymami litycznymi, jak również kontrole bez enzymów stanowiące odnośną.

Jakość wyizolowanego DNA bakterii Cms oceniano na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych oraz poprzez analizę wyników w żelu agarozowym po uprzednim rozdziale prowadzonym pod napięciem elektrycznym, natomiast efektywność izolacji na podstawie wyników testu molekularnego PCR.