

OCENA OBECNOŚCI ŚLIZÓW BAKTERYJNYCH W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ ZRÓŻNICOWANYCH MUKOIDALNIE SZCZEPÓW BAKTERII Cms

mgr inż. Katarzyna Salamońska, dr inż. Włodzimierz Przewodowski
mgr inż. Dorota Szarek, mgr inż. Wioleta Stochla, dr inż. Agnieszka Przewodowska
IHAR-PIB Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii
e-mail: salamonska89@gmail.com

Kwarantanna bakteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms), wywołująca bakteriozę pierścieniową ziemniaka, przysparza wielu trudności diagnostycznych. Ze względu na wysoką czułość i specyficzność jednymi z metod zalecanych do identyfikacji sprawcy choroby są metody molekularne. Enzymy stosowane w tych metodach mogą być hamowane przez niektóre substancje (inhibitory), co wiąże się z ryzykiem otrzymania fałszywych wyników. Przyczyną ww. problemów są przede wszystkim związki obecne w tkankach roślinnych i środowisku naturalnym, z którego pozyskiwane są próby do badań. Substancje takie jak polisacharydy, polifenole, egzonukleazy i inhibitory proteaz, jak również inne wpływające negatywnie na czułość metod molekularnych, powinny zostać usunięte na etapie ekstrakcji kwasów nukleinowych z badanych prób.

Problemy z otrzymaniem czystego materiału genetycznego mogą pojawiać się również na poziomie samych komórek bakteryjnych. Bakterie Cms, klasyfikowane jako gram dodatnie, mają grubą ścianę komórkową, która może utrudniać izolację DNA/RNA. Szczególne trudności mogą powodować także komponenty śluzów bakteryjnych znajdujące się na powierzchni badanych komórek. Z uwagi na duże zróżnicowanie pod względem wytwarzania otoczki egzopolisacharydowej przez bakterie Cms problematyczna okazuje się identyfikacja szczepów, które wytwarzają duże ilości śluzów. Dlatego bardzo ważnym etapem w diagnostyce molekularnej bakterii Cms jest etap izolacji kwasów nukleinowych z komórek bakteryjnych warunkujący eliminację inhibitorów, a przez to poprawność tych metod.

Celem pracy była ocena efektywności izolacji DNA i określenie wpływu obecności śluzu bakteryjnego na czułość testu PCR. Zastosowano udoskonaloną metodę ekstrakcji DNA, której skuteczność sprawdzano, izolując materiał genetyczny ze szczepów Cms o różnym stopniu mukoidalności.

Pierwszym etapem badań było namnożenie zróżnicowanych mukoidalnie szczepów Cms na podłożach mikrobiologicznych. Po uzyskaniu kolonii dla każdego ze szczepów sporządzono zawiesiny o koncentracji 10^0 do 10^6 jtk/ml (jednostka tworząca kolonie w 1 ml). Tak przygotowane zawiesiny poddano izolacji DNA, stosując opracowaną metodę ekstrakcji. Aby uzyskać jak największe zróżnicowanie, przy identyfikacji molekularnej badanych szczepów Cms stosowano wrażliwy na działanie inhibitorów obecnych w środowisku klasyczny test PCR z enzymem polimeraza Taq DNA. Skuteczność metody oceniano na podstawie rozdziału elektroforetycznego DNA uzyskanego w teście PCR.