

Ochrona

TECHNIKA PCR I JEJ MODYFIKACJE W IDENTYFIKACJI PATOGENÓW ZIEMNIAKA

mgr inż. Joanna Chołuj, dr inż. Włodzimierz Przewodowski
IHAR – PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie
e-mail: wlodzimierz.przewodowski@tu.koszalin.pl

Streszczenie

Techniki biologii molekularnej znajdują coraz szersze zastosowanie w wykrywaniu i identyfikacji patogenów ziemniaka. Jedną z nich, cieszącą się dużą popularnością, jest metoda PCR bazująca na łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction). Na przełomie lat powstały różne modyfikacje metody, które mają wiele nowych zalet. W pracy przedstawiono możliwości zastosowania różnych technik PCR w diagnostyce patogenów ziemniaka. Zaprezentowano także sposoby opracowania i wykorzystania modyfikacji PCR przez zespół Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie.

Słowa kluczowe: DNA, łańcuchowa reakcja polimerazy, modyfikacje PCR

Istnieje wiele metod wykrywania i identyfikacji drobnoustrojów chorobotwórczych. Tradycyjne, dobrze opracowane sposoby identyfikacji patogenów wymagają niejedno-

krotnie dużego nakładu czasu i pracy oraz doboru wykwalifikowanego, doświadczonego personelu. W ostatnich latach metody analityczne zostały wzbogacone w nowoczesne,

szybkie testy molekularne. Cieszą się one dużą popularnością przede wszystkim dzięki zwiększonej czułości i specyficzności oraz znacznemu przyspieszeniu procedury badawczej. Jedną z takich grup są metody molekularne oparte na technice PCR.

Technika PCR – zasada działania i zastosowanie

Technika ta wykorzystuje w warunkach *in vitro* łańcuchową reakcję termostabilnego enzymu – polimerazy Taq do powielenia (amplifikacji) wybranego fragmentu genomu, pochodzącego z poszukiwanego mikroorganizmu, i uzyskania miliardowych kopii badanego fragmentu genomu. Genom większości organizmów jest zbudowany z kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), długiej nici, złożonej zwykle z dwóch pojedynczych łańcuchów tworzących tzw. dwuniciowy DNA – dsDNA. Łańcuchy te związają się wokół wspólnej osi, tworząc tzw. podwójną helisę. Jednym ze sposobów rozdzielania (denaturacji) podwójnej helisy DNA na dwie pojedyncze nici jest działanie wysokiej temperatury.

Pod względem molekularnym cząsteczka DNA jest zbudowana z czterech zasad azotowych: adeniny A, guaniny G oraz cytozyny C i tyminy T, odpowiednio purynowych i pirymidynowych, które specyficznie wiążąc się ze sobą, tworzą pary zasad A-T (A-U), G-C. Oprócz zasad, które skierowane są do wnętrza helisy, występują również reszty cukrowe i fosforanowe, które znajdują się na zewnątrz DNA.

Odkrycie DNA i poznanie jego struktury było niewątpliwie jednym z najważniejszych osiągnięć w biologii molekularnej. Opracowanie techniki PCR przyczyniło się do dużego postępu w rozwoju wielu metod diagnostycznych w różnych dziedzinach życia. Znaczenie tego odkrycia było tak istotne, że twórca PCR, Kary Mullis, został uhonorowany pod koniec XX w. nagrodą Nobla.

Istotą diagnostyki molekularnej opartej na zastosowaniu klasycznego testu PCR jest analiza i wykorzystanie określonych sekwencji kwasów nukleinowych DNA lub RNA. Aby umożliwić syntezę dużej liczby

kopii dowolnego fragmentu genomowego DNA, konieczne jest opracowanie odpowiedniej mieszaniny reakcyjnej PCR, w skład której wchodzi następujące składniki:

1. matryca – fragment DNA identyfikowanego patogenu, zwany matrycowym, który ma być namnożony;

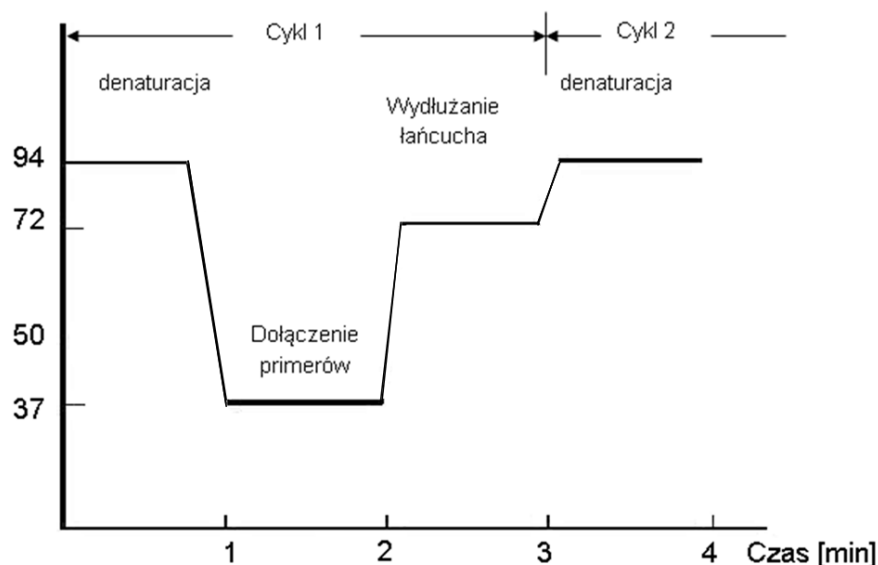
2. startery – krótkie, najczęściej ok. 20-[nukleotydowe](#) fragmenty DNA [komplementarne](#), czyli pasujące do określonych fragmentów matrycy;

3. trójfosforany [deoksyrybonukleozydów](#) – budulec nowej nici DNA;

4. termostabilna polimeraza Taq – enzym pochodzący z bakterii *Thermus aquaticus* (Taq). Bakterie te zostały wyizolowane w 1969 r. z gorących źródeł Yellowstone przez Thomasa Brocka (Brock, Freeze 1969), a 6 lat później wyizolowano z nich polimerazę Taq (Chien i in. 1976). Charakterystyczną właściwością polimerazy jest termostabilność w zakresie 37-94°C, co oznacza, że jest ona oporna na wysokie temperatury panujące w mieszaninie reakcyjnej (Bartkowiak 2003). Termostabilność polimerazy Taq stała się podstawą metody PCR (Gabryelska i in. 2009).

Aby mogło dojść do reakcji PCR, oprócz odpowiednio dobranego składu mieszaniny reakcyjnej konieczne jest zapewnienie optymalnych warunków temperaturowych, które umożliwia termocykler – urządzenie wyposażone w blok grzejny, zapewniające szybką i precyzyjną zmianę temperatury na poszczególnych etapach reakcji. W termocyklach charakteryzujących się dobrymi parametrami zmiana temperatury o kilkadziesiąt stopni następuje w przeciągu zaledwie kilku sekund.

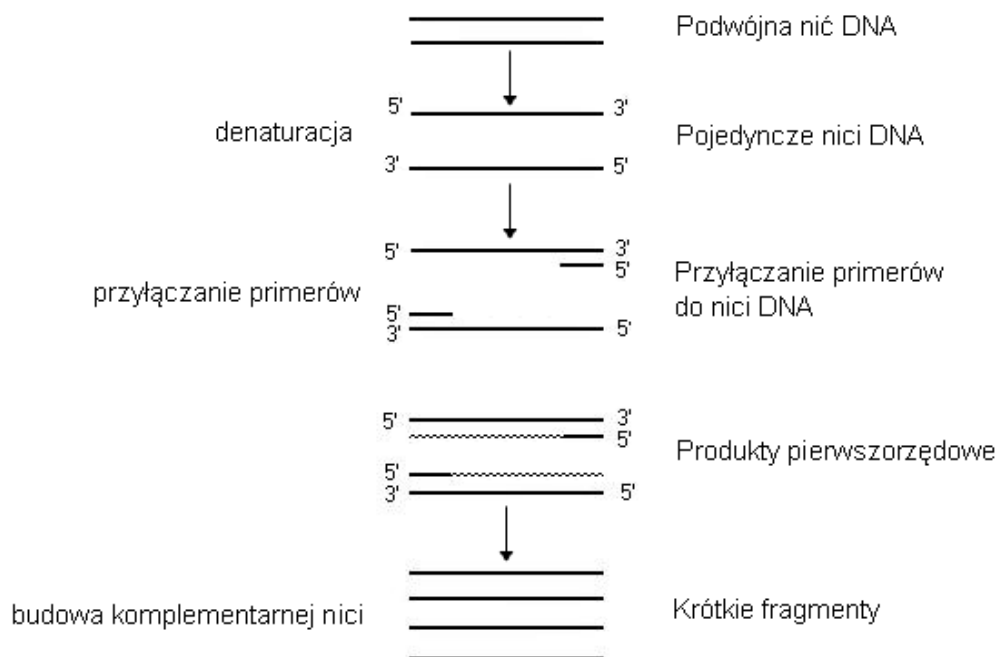
Technika PCR w układzie klasycznym przebiega w trzech, cyklicznie powtarzanych etapach, z których każdy charakteryzuje się odpowiednio dobraną temperaturą oraz czasem inkubacji (Bartkowiak 2003). Każdy cykl składa się kolejno z denaturacji (rozpadu) DNA (90-95°C), przyłączania starterów (40-65°C) oraz syntezy DNA (wydłużania łańcucha DNA w temperaturze ok. 72°C). Przykładowy profil termiczny techniki PCR przedstawiono na rysunku 1.



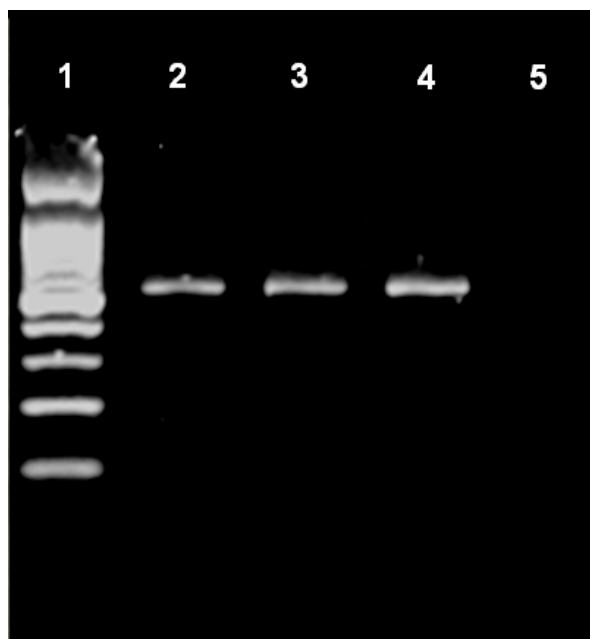
Rys. 1. Przykład profilu termicznego cyklu w reakcji PCR

Dzięki wysokiej temperaturze w czasie denaturacji podwójna nić DNA zostaje rozpleciona do pojedynczych nici. Na kolejnym etapie do każdej z tych nici następuje specyficzne przyłączenie pary starterów do fragmentów DNA. Wówczas polimeraza odbudowuje na każdej z nici brakujący, komplementarny odcinek, przez co uzyskuje się w ten sposób wierną kopię namnożonego

fragmentu DNA (Raszka i in. 2009). W następnym cyklu każdy powstający produkt służy jako matryca. Dzięki temu technika PCR umożliwia zwielokrotnienie, nawet miliardkrotne niewielkich ilości DNA (Bał 2001). Sposób powstawania nowych odcinków DNA przedstawiono na poniższym schemacie (rys. 2).



Rys. 2. Model reakcji PCR



Rys. 3. Przykładowy obraz elektroforetyczny produktów reakcji PCR
(Źródło własne: PDMiB ZNiOZ w Boninie)

Aby móc ocenić jakość i ilość uzyskanego DNA, produkty reakcji PCR należy poddać dalszej analizie. W przypadku klasycznych metod PCR najczęstszą metodą oceny jest analiza elektroforetyczna produktów PCR w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym (Raszka i in. 2009). Metody te pozwalają określić zarówno obecność, jak i wielkość i ilość powstałych produktów. Obecność lub brak prążka o określonej wielkości świadczy odpowiednio o obecności lub braku wykrywanego mikroorganizmu w badanej próbce. Przykładowy rozdział elektroforetyczny został zaprezentowany na rysunku 3. Na pierwszej ścieżce znajduje się marker, czyli znacznik wielkości produktu. Na kolejnych trzech ścieżkach wystąpiły prążki wskazujące na obecność badanych patogenów w próbach, natomiast w piątej studzience została umieszczona kontrola negatywna. Brak prążka w przypadku kontroli negatywnej świadczy o poprawnie przeprowadzonej reakcji oraz braku kontaminacji.

Poza wieloma wspomnianymi zaletami PCR istnieją również słabe strony metody. Zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy do prób uzyskanych bezpośrednio z materiału roślinnego często wiąże się z trudnościami z powodu obecności inhibitorów, które mogą znacząco spowolnić reakcję PCR lub całkowicie ją zahamować. Inhibitorami mogą być zarówno związki organiczne, i jak i

nieorganiczne różnego pochodzenia, np. polisacharydy, związki fenolowe, które licznie występują w tkance ziemniaka (Goerke 2001). W ten sposób może dojść do sytuacji, kiedy pomimo obecności patogenu (bakterii, wirusa itp.) w badanej próbce wynik reakcji będzie fałszywie negatywny. Dlatego na podstawie standardowej procedury PCR powstało wiele modyfikacji, które pozwalają polepszyć możliwości badawcze.

Modyfikacje PCR

- Nested-PCR – zwany inaczej „gniazdowym”, polega na przeprowadzeniu klasycznej reakcji PCR z pierwszą parą starterów, a kolejnej z drugą parą starterów, zlokalizowanych bliżej środka powielanego fragmentu DNA. Pozwala to na zwiększenie czułości i specyficzności metody. Technikę tę najczęściej stosuje się do wykrywania i identyfikacji bakterii.

- Multiplex PCR – umożliwia zastosowanie kilku par starterów dla różnych patogenów w jednej próbce, co pozwala na jednoczesne wykrywanie 2-3 patogenów o podobnych wymaganiach termicznych reakcji PCR i różnej długości namnożonych odcinków DNA. Z kolei zastosowanie kilku par starterów dla jednego patogenu umożliwia uzyskanie znacznie większej specyficzności oraz pozwala na przyspieszenie badania większych obszarów DNA. Metoda ta daje dużą oszczędność czasu i obniża koszty badań przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości uzyskiwanych wyników. Warunkiem poprawnych wyników metody Multiplex PCR jest zastosowanie starterów o wysokiej specyficzności gatunkowej.

- Real-Time PCR – technika PCR charakteryzująca się możliwością monitorowania przyrostu produktów reakcji PCR w czasie jej trwania. Jest to możliwe dzięki dodaniu do mieszaniny reakcyjnej specjalnie dobranych barwników lub sond fluorescencyjnych. Barwniki te, łącząc się z kwasami nukleinowymi, wysyłają sygnał fluorescencyjny proporcjonalny do ilości produkowanego DNA, mierzalny przez przystosowany do tego celu termocykler Real-Time PCR (Harms 2003). Analiza produktu w czasie rzeczywistym pozwala na oszacowanie początkowej ilości badanego DNA. Ponieważ wszystkie etapy procesu przeprowadza się w zamkniętych

naczyniach, technika Real-Time PCR do minimum ogranicza ryzyko zanieczyszczenia próby. Metoda charakteryzuje się dużą czułością i szybkością wykonania, jednakże jej wadą jest relatywnie wysoki koszt urządzenia oraz odczynników.

- RT-PCR – jest stosowany, gdy matrycą jest RNA. Ma to szczególne odniesienie do patogenów takich jak wirusy, które nie posiadają DNA. Wówczas wykorzystuje się enzym zwany odwrotną transkryptazą, dzięki której mRNA jest przepisywane do cDNA (komplementarnego DNA) stanowiącego z kolei matrycę do klasycznego PCR. Zaletą tego sposobu jest znaczne zwiększenie czułości metody w porównaniu ze standardowym PCR (Raszka i in. 2009). Technika RT-PCR często jako jedyna daje możliwość zastosowania PCR w diagnostyce i badaniu wirusów.

Wybór właściwej diagnostycznej metody molekularnej zależy od potrzeb i stanu wiedzy na temat materiału, z którego izoluje się materiał genetyczny badanego patogenu. Jeżeli badane próby charakteryzują się obecnością inhibitorów reakcji PCR, należy zastosować modyfikacje pozwalające na usunięcie tych inhibitorów lub złagodzenie skutków ich działania. Spośród takich modyfikacji należy wymienić następujące:

- IC/Real-Time RT-PCR – stanowi połączenie metod immunologicznego wyłapywania i zagęszczania wirusa (ang. Immunocapture, IC) oraz identyfikacji techniką RT-PCR w czasie rzeczywistym. Zasada metody polega na początkowym wykrywaniu antygenu wirusowego (w postaci wirionów) przez specyficzne przeciwciała i następną reakcję RT-PCR, która przez ogrzewanie prowadzi do dysocjacji wirionów, w celu uwolnienia genomowego RNA bez konieczności ekstrakcji całkowitego RNA. Z uwagi na obecność komponentów soku podczas izolacji wirusów z ekstraktów roślinnych ilościowe oznaczenie wirusa metodami PCR z reguły stanowi poważny problem. Dzięki zastosowaniu etapu immunokoncentracji ogranicza się negatywny wpływ soku roślinnego oraz zwiększa specyficzność i czułość tej metody. Ponadto poprzez pominięcie pracochłonnego etapu izolacji RNA technika ta jest przydatna do masowego wykrywania wirusa.

- Multiplexed PCR-ELISA, opracowany w 2003 r. przez Millsa i Russella, łączy metodę molekularną i serologiczną. W pierwszym etapie następuje amplifikacja trzech specyficznych fragmentów genomu Cms, natomiast w drugim produkty amplifikacji wykrywa się za pomocą testu ELISA. Metoda ta pozwala wyeliminować reakcje fałszywie pozytywne, a ponadto cechuje się bardzo wysoką specyficznością (Mills, Russell 2003).

- Metoda „dig-labeled PCR” – opracowana przez Lee i innych (2001). Namnożony w wyniku reakcji PCR fragment DNA jest znakowany digoksygeniną, nanoszony na membranę nylonową i wykrywany za pomocą reakcji immunoenzymatycznej. Metoda ta pozwala na znacznie łatwiejsze i szybsze wykrywanie produktu PCR niż technika elektroforetyczna (Lee i in. 2001).

- PCR-ELOSA (ang. enzyme-linked oligosorbent assay) – również wykorzystuje reakcję immunoenzymatyczną, przeprowadzana jest z użyciem mikropłytek do testu ELISA. Wynik reakcji enzymatycznej jest mierzony kolorymetrycznie. Technika ELOSA jest o 13% czulsza w stosunku do technik PCR z użyciem elektroforezy (Baer i in. 2001).

- TaqMan BIO-PCR – polega na zwiększeniu liczebności bakterii na pożywce agarowej przed przystąpieniem do reakcji Real-Time PCR, w wyniku czego zwiększa się czułość testu i obniża poziom inhibitorów reakcji PCR (Schaad i in. 1999).

Metody wykorzystujące łańcuchową reakcję polimerazy charakteryzują się z reguły dużą specyficznością przeprowadzanych analiz, jednakże w celu zwiększenia czułości reakcja PCR wymaga niejednokrotnie dopracowania poprzez optymalizację. Wykorzystując reakcję amplifikacji z zastosowaniem odpowiednich starterów PCR, można wykryć obecność patogenu (wirusa, bakterii itp.) znajdującego się w niewielkiej koncentracji. Rozwój biologii molekularnej oraz molekularnych metod diagnostycznych znacząco ułatwia analizę mikroorganizmów w porównaniu z konwencjonalnymi metodami, trudnymi w realizacji głównie ze względu na problemy z uzyskaniem czystych kultur mikroorganizmów (bakterii) lub cząstek wirusowych.

Przykładowo, przy przenoszeniu wirusów przez nasiona testy molekularne wykrywają zarówno cząstki wirusowe infekcyjne, jak i nieinfekcyjne, natomiast test biologiczny tylko infekcyjne. Z drugiej strony dynamiczny rozwój diagnostyki molekularnej nie prowadzi do eliminowania metod klasycznych, które w dużym stopniu je uzupełniają, a niekiedy wręcz stanowią narzędzie do ich weryfikacji. Zazwyczaj pojawiające się nowe techniki molekularne na etapie opracowania i weryfikacji wymagają jednej lub wielu różnych klasycznych technik diagnostycznych (biochemicznych, morfologicznych, serologicznych i molekularnych) jako układu odniesienia i potwierdzenia prawidłowości uzyskanych wyników.

Doskonałym przykładem zastosowania modyfikacji pozwalającej na usunięcie inhibitorów reakcji PCR jest nowy test filtracyjny typu Flow-Through do szybkiej i specyficznej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms), opracowany i opatentowany przez naukowców z Zakładu Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie (Przewodowski 2012; Przewodowski, Barnyk 2009). Zespół Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii, wykorzystując specjalnie zmodyfikowaną chemicznie, porowatą strukturę błony z osadzonymi kowalencyjnie, specyficznymi wobec komórek bakterii Cms przeciwciałami, opracował sposób koncentracji komórek bakterii Cms z dużej objętości na małej powierzchni przy jednoczesnym usunięciu substancji mogących hamować reakcję PCR (Przewodowski 2012). To proste, a zarazem skuteczne innowacyjne rozwiązanie pozwala na szybkie usunięcie inhibitorów reakcji PCR przy jednoczesnym zwiększeniu czułości i specyficzności testu PCR.

Literatura

Bal J. 2001. Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wyd. Nauk. PWN War-

szawa; **2. Baer D., Mitzel E., Pasche J., Gudmestad N. 2001.** PCR detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* – infected tuber samples in a plate capture assay. – Am. J. Potato Res. 78 (4): 269-277; **3. Bartkowiak J. 2003.** Badania molekularne w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób zakaźnych. – Prz. Epid. 57: 381-389; **4. Brock T. D., Freeze H. 1969.** *Thermus aquaticus*, a nonsporulating extreme thermophile – J. Bacteriol. Apr. 98(1): 289-97; **5. Chien A., Edgar D. B., Trela J. M. 1976.** Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermusaquaticus*. – J. Bacteriol. Sep. 127(3): 1550-1557; **6. Gabryelska M., Szymański M., Barciszewski J. 2009.** DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć. – Nauka 2: 111-134; **7. Goerke Ch., Bayer M. G., Wolz Ch. 2001.** Quantification of Bacterial Transcripts during Infection Using Competitive Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. – Clin. Diagn. Lab. Immunol 8(2): 279-282; **8. Harms G., Layton A. C., Dionisi H. M., Gregory I. R., Garrett V. M., Hawkins S. A., Robinson K. G., Saylor G. S. 2003.** Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. – Environ. Sci. Technol. 37 (2): 343-351; **9. Lee I.-M., Lukaesko L. A., Maroon C. J. M. 2001.** Comparison of dig-labeled PCR, nested PCR, and ELISA for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field grown potatoes. – Plant Dis. 85: 261-266; **10. Mills D., Russell B. W. 2003.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato stems and tubers by multiplexed PCR-ELISA. – Am. J. Potato Res. 80: 223-234; **11. Przewodowski W., Barnyk A. 2009.** Szybki test do identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. – Prog. Plant Prot. 49 (2): 696-700; **12. Przewodowski W. 2012.** Sposób wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* z wykorzystaniem membran zawierających immobilizowane przeciwciała. Patent UP RP nr 213857; **13. Raszka A., Ziemińska A., Wiechetek A. 2009.** Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej. – Czas. Tech. PK. Środowisko. 2-Ś, 2/106: 101-114