

## WPLYW SPOSOBU IZOLACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH BAKTERII CMS NA CZUŁOŚĆ TESTU PCR

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

Izolacja kwasów nukleinowych (DNA/RNA) patogenów roślin jest ważnym początkowym etapem wielu procedur diagnostycznych stosowanych w biologii molekularnej, warunkującym poprawność identyfikacji tych patogenów. Jednym z najważniejszych elementów, pozwalających na uzyskanie wysokiej czułości testu molekularnego, jest odpowiednia jakość wyizolowanego materiału genetycznego oraz możliwość usunięcia substancji, które mogłyby niekorzystnie wpłynąć na wynik reakcji PCR. Oba te parametry w znacznym stopniu są uzależnione od sposobu izolacji kwasów nukleinowych pozwalającego na efektywny przebieg testu.

Dlatego też celem przeprowadzonych w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii badań było porównanie różnych sposobów izolacji kwasów nukleinowych na jakość wyizolowanego DNA bakteryjnego oraz zbadanie wpływu tych metod na czułość testu PCR.

Materiałem badawczym były komórki bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* przygotowane w postaci wykalibrowanych, świeżo sporządzonych zawiesin w sterylnej wodzie oraz ekstrakcie roślinnym w zakresie od 1 do 100 mln jednostek tworzących kolonie [jtk].

Porównywano kilka metod izolacji DNA. Pierwszą z nich była metoda wysokosolna, która pozwala na selektywne wytrącanie kwasów nukleinowych w obecności wysokich stężeń soli. Ekstrakcję genomowego DNA przeprowadzano również przy wykorzystaniu buforu CTAB, umożliwiającego z jednej strony usunięcie komponentów tkanek roślinnych, z drugiej zaś destrukcję błon i uwolnienie kwasów nukleinowych z komórek bakterii. Inna metoda uzyskiwania DNA z badanych bakterii polegała na bezpośrednim wykorzystaniu komórek Cms do testu PCR po uprzednim poddaniu ich oddziaływaniu wysokiej temperatury. Jako próbę kontrolną stosowano zawiesiny bakteryjne, które pobierano bezpośrednio do testu PCR bez jakichkolwiek modyfikacji. Jakość wyizolowanego DNA oceniano na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych w zakresie UV oraz rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym, natomiast czułość metod oceniano, obserwując wynik na żelu agarozowym po uprzedniej amplifikacji PCR.

Uzyskane wyniki wskazały na znaczne zróżnicowanie efektywności stosowanych metod zarówno w stosunku do jakości wyizolowanego DNA, jak i czułości testu PCR.