

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je *in vitro* metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA. Reakce využívá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s protichůdnými vlákny DNA a od jejich 3'- konců je zahájena syntéza komplementárních řetězců. Syntéza nových komplementárních vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou. Opakování cyklů, které zahrnují denaturaci DNA templátů (denaturation), hybridizaci primerů (annealing) a syntézu komplementárních vláken DNA (extension), má za výsledek exponenciální nárůst počtu specifických DNA fragmentů. Konce fragmentů jsou určeny 5'- konci primerů. Protože primery musí být chemicky syntetizovány, musíme znát alespoň počáteční a koncové sekvence amplifikovaného úseku.

PCR je velice citlivá metoda, která umožňuje detekci „jediné kopie“ DNA (prakticky $10^2 - 10^5$ kopií templátové molekuly) ve vzorku tím, že určenou sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detekovat.

Restrikční endonukleázy jsou enzymy schopné rozpoznat specifické sekvence nukleotidů na dvoušroubovici DNA a toto místo specifickým způsobem štěpit. Různé restrikční endonukleázy rozpoznávají různé sekvence obvykle o velikosti 4 až 6 nukleotidů. Taková přesnost a reprodukovatelnost je významná pro celou řadu molekulárně-biologických technik jako např. klonování genů nebo DNA segmentů nebo délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP).

PCR-RFLP analýza umožňuje detekovat sekvenční variabilitu PCR produktů. Vlastní postup se skládá z PCR amplifikace konkrétního úseku DNA a jeho štěpení vybranou restrikční endonukleázou. Restrikční místa mohou mutacemi vznikat i zanikat, což se projeví změnou počtu a velikosti získaných restrikčních fragmentů, které detekujeme pomocí gelové elektroforézy. Jsou tak získány informace o polymorfismu PCR produktů, které můžeme využít při hodnocení genetické variability studovaných organismů a jejich identifikaci.

Typickým příkladem diagnostického využití metody je identifikace bakterií na základě PCR-RFLP analýzy 16S rDNA genu. Tento gen představuje univerzální fylogenetický marker bakterií, jehož sekvence může nést druhově specifická restrikční místa. Kombinací vhodných restrikčních endonukleáz je pak možné identifikovat daný druh bakterie.

Fytoplazmy jsou jednoduché bakterie bez pevné buněčné stěny kolonizující floém (sítkovice) rostlin nebo buňky a tkáň hmyzích vektorů. Přenos fytoplazem se uskutečňuje pomocí bodavě savého hmyzu z řádu Heteroptera, a to mer (*Psyllidae*), kříšů (*Auchenorrhyncha*) a ploštic (*Miridae*). Bodavě savý hmyz je nejen vektorem, ale zároveň i alternativním hostitelem fytoplazem. Fytoplazmy se rozšiřují také vegetativně, a to pomocí roubů, oček a hlíz; mohou se přenášet také kořenovými srůsty a prostřednictvím parazitických rostlin, zejména kokotice.

Amplifikace parciální sekvence 16S rDNA fytoplazem ve vzorcích celkové DNA izolovaných z rostlin infikovaných fytoplazmami (Cvičení I)

Detekce a identifikace fytoplazem bude provedena ve vzorcích celkové DNA izolovaných z rostlin infikovaných fytoplazmami: *Candidatus Phytoplasma asteris*, *Candidatus Phytoplasma ulmi*, *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* a *Candidatus Phytoplasma solani*.

Postup:

1. PCR amplifikace parciální sekvence 16S rDNA fytoplazem pomocí primerů R16F2 a R16R2M – příprava PCR reakční směsi.

Nejdříve si podle počtu vzorků a zvoleného objemu reakce připravte PCR reakční směs, a to smícháním položek v daném pořadí. Po důkladném promíchání (Vortex) a odstředění rozpipetujte směs do 0,2ml PCR zkumavek a přidejte vzorek. Opět promíchejte (Vortex), stočte na minicentrifuze a vložte do naprogramovaného cykléru.

Během přípravy PCR reakční směsi dodržujte následující pravidla:

- Reakční směs připravujte a pracujte s ní vždy ve chlazených zkumavkách (chladičí stojánek, ledová tříšť).
- S Taq polymerázou manipulujte jen po nezbytnou dobu, vždy ji chladte a ihned ukládejte do mrazicího boxu (-20 °C).
- Pipety, které používáte k přípravě zásobních roztoků a reakční směsi, nikdy nepoužívejte k pipetování vzorků nebo produktů reakce. Podobně nemůžete stejnou pipetu používat k pipetování vzorků a produktů. V těchto případech hrozí nebezpečí kontaminace, kdy jsou výsledkem falešné pozitivní reakce (vzhledem k vybavení laboratoře nebude toto pravidlo dodrženo).

Primery: R16F2 5'-ACg ACT gCT AAg ACT gg -3'
R16R2M 5'-TgA Cgg gCg gTg TgT ACA AAC CCC g -3'

GoTaq® DNA Polymerase		F2/R2		
	Koncentrace prac. roztoku	Konečná koncentrace	Pipetuj	1 test
Pufr	5 x	1 x		5 µl
MgCl ₂	25 mM	0 mM		0,0 µl
Voda				14,8 µl
dNTP	2 mM	200 µM		2,5 µl
f primer	20 pmol/µl	0,2 µM		0,25 µl
r primer	20 pmol/µl	0,2 µM		0,25 µl
Taq pol	5 U/µl	1 U/reakc e		0,2 µl
CELKEM				23 µl
Objem reakce		25 µl	Rozpipetuj po	
VZOREK	2 µl			

2. Teplotní program PCR reakce.

Počáteční denaturace 94 °C 2 min

35 cyklů denaturace 94 °C 60 s

 nasedání primerů (anealing) 50 °C 60 s

 syntéza DNA (elongace) 72 °C 60 s

Konečná elongace 72 °C 7 min

3. Stanovení velikosti PCR produktu pomocí gelové elektroforézy.

Velikost PCR produktu stanovte elektroforeticky v 1,0% agarózovém gelu v TAE pufriu. Použijte standard molekulové váhy GeneRuler 100+ bp DNA Ladder (2 μ l na dráhu). Fluorescenční barvivo GoodView přidávejte do rozvařeného agarózového gelu (2 μ l na 50 ml). Separaci proveďte při 80 V po dobu 30 – 40 minut.

Očekávaná velikost PCR produktu je cca 1200 bp.

Příprava 1% agarózového gelu v TAE pufriu, provedení elektroforézy a vizualizace:

- Rozvařte 0,5 g agarózy v 50 ml TAE pufriu (láhev se šroubovacím uzávěrem, mikrovlnná trouba).
- Připravte si vaničku (10 x 10 cm) horizontální elektroforézy. Do 50 ml rozvařeného agarózového gelu (cca 50 °C) přidejte 2 μ l barviva GoodView, promíchejte a vlijte do připravené vaničky.
- Po ztuhnutí gelu (např. 15 min při RT, 15 min v chladničce) opatrně vyjměte hřebínek a vaničku vložte do elektroforetické komůrky (jamky u katody '-'). Komůrku naplňte TAE pufrem tak, aby byl gel převrstven 2 až 5 mm pufriu (po kontrolní rysku).
- Vzorek pro analýzu výsledku PCR připravte smícháním 5 μ l reakční směsi s 1 μ l vzorkovacího roztoku.
- Mikropipetou plňte jamky v gelu vzorky (6 μ l). Vzorky nanášejte zleva doprava a rozmístění vzorků zaznamenejte do protokolu; do první jamky pipetujte standard molekulové váhy.
- Zapojte zdroj stejnosměrného elektrického proudu (černý vodič '-', červený '+'). Negativně nabitě molekuly DNA se pohybují od anody (-) ke katodě (+).
- Na zdroji nastavte 80V a nechte elektroforetickou separaci probíhat, až modrá zóna odpovídající bromfenolové modři urazí dráhu cca 2 cm.
- Po rozdělení vzorků vypněte zdroj a odpojte elektroforetickou komůrku od elektrického proudu. Gel opláchněte destilovanou vodou a vložte do UV transluminátoru (dokumentační systém Syngene). Pozitivním výsledkem bude PCR produkt odpovídající očekávané velikosti amplifikovanému segmentu.

Identifikace fytoplazem pomocí RFLP analýzy PCR produktů (Cvičení II)

Pomocí vybraných restričních endonukleáz (např. Alu I, Rsa I, Mse I) bude provedena RFLP analýza získaných PCR produktů odpovídající velikosti (cca 1200 bp). Produkty štěpení budou separovány pomocí gelové elektroforézy. Výsledná restriční spektra budou porovnána se PCR-RFLP markery známých druhů fytoplazem a určen druh fytoplazmy.

Postup:

1. Příprava reakční směsi pro štěpení PCR produktu restričními endonukleázami

RFLP reakční směs připravíte smícháním 5 μ l deionizované vody, 2 μ l 10x pufriu, 2 μ l AC-BSA, 1 μ l restričního enzymu; na závěr přidáte 10 μ l PCR produktu. Důkladně promíchejte a stočte na minicentrifuze. Pokud provádíte štípání na Dry bloku kápněte do každé zkumavky jednu kapku minerálního oleje, který zabrání odpařování reakční směsi během inkubace. Zkumavky inkubujte min 2 h při 37 °C termobloku.

Pokud daná restriční endonukleáza nevyžaduje přídavek AC-BSA, nahraďte ji deionizovanou vodou.

2. Příprava 1,5 % agarózového gelu a RFLP analýza produktu štěpení

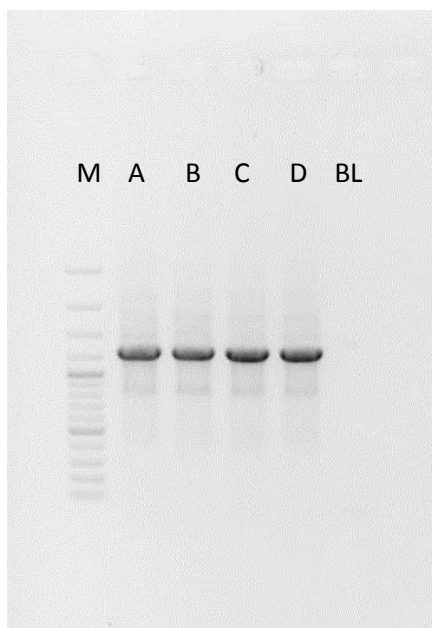
- Rozvařte 0,75 g agarózy v 50 ml TAE pufriu (láhev se šroubovacím uzávěrem, mikrovlnná trouba). Dále postupujeme jako při přípravě 1% gelu.
- K PCR produktu (20 μ l) přidejte 4 μ l vzorkovacího roztoku, promíchejte pipetou, centrifugujte na minicentrifuze.
- Mikropipetou plňte jamky v gelu vzorky (10 μ l). Vzorky nanášejte zleva doprava a rozmístění

vzorků zaznamenejte do protokolu; do první jamky pipetujte standard molekulové váhy (GeneRuler 100+ bp DNA Ladder).

- Zapojte zdroj elektrického proudu (černý vodič '-', červený '+'). Negativně nabitě molekuly DNA se pohybují od anody (-) ke katodě (+).
- Nastavte na zdroji 80V a nechte elektroforetickou separaci probíhat 50-60 min.
- Po rozdělení vypněte zdroj a odpojte elektroforetickou komůrku od elektrického proudu. Gel opláchněte destilovanou vodou a umístěte na UV transluminátor (dokumentační systém Syngene).

Výsledkem jsou restrikční fragmenty. Porovnáním RFLP profilu vzorků se standardy určíte druh fytoplazmy.

Obrázek 1: Detekce 16S rDNA fytoplazem pomocí PCR s primery 16F2/16R2M



M - GeneRuler 100+ bp DNA Ladder; A - *Candidatus* Phytoplasma asteris, B - *Candidatus* Phytoplasma ulmi, C - *Candidatus* Phytoplasma mali, D - *Candidatus* Phytoplasma prunorum, BL – negativní kontrola; 1,0% AGSA/TAE; GoodView 3 μ l/50 ml gel; foto 500 ms, vzorky po 3 μ l, 80-70 V ; dráha cca 3 cm

Obrázek 2: Restrikční profily PCR produktu 16S rDNA známých druhů fytoplazem získané pomocí Rsa 1



M - GeneRuler 100 bp DNA Ladder; A - *Candidatus* Phytoplasma asteris nebo *Candidatus* Phytoplasma solani, B - *Candidatus* Phytoplasma ulmi, C - *Candidatus* Phytoplasma mali nebo *Candidatus* Phytoplasma pyri, D - *Candidatus* Phytoplasma prunorum, BL – negativní kontrola; 2 % Agaróza/TAE; GoodView 3,0 μ l/50 ml gel, foto 500 ms, 60 V, dráha BFM 3 cm