

**Diagnostyka**  
**Diagnostic**

**Testy Rep-PCR do identyfikacji bakterii**

**Zakres**

Standard ten opisuje w jaki sposób przeprowadzać testy Rep-PCR do identyfikacji izolatów bakterii.

**Zatwierdzenie i nowelizacja**

Zatwierdzony jako Standard EPPO 2010-09.

**Wprowadzenie**

Genomowy „odcisk palca” Rep-PCR polega na wykorzystaniu komplementarnych starterów DNA do występujących w naturze; wysoce chroniona, powtarzalna sekwencja DNA, obecna w licznych kopiach w genomach większości bakterii Gram-negatywnych i niewielu Gram-pozytywnych (Louws et al., 1994; Rademaker et al., 1998; Watts et al., 2001).

Powtarzalne sekwencje zostały zidentyfikowane w przypadku trzech rodzin, włączając powtarzalne poza genowe palindromiczne sekwencje 35–40 pz (REP), wewnątrz bakteryjne powtarzalne wewnątrz genowe zgodne sekwencje 124–127 pz (ERIC), oraz 154 pz BOX (Versalovic et al., 1994). Sekwencje te są zlokalizowane w odrębnym miejscu wokół genomu.

Startery zaprojektowane zgodnie z tą sekwencją mogą po amplifikacji PCR odróżniać odrębne regiony genomu zlokalizowane pomiędzy elementami REP, ERIC lub BOX. Zamplifikowane fragmenty mogą zostać rozdzielone na żelu, wydajność profilu odpowiada genomowemu Rep-PCR „odciskowi palca”. Przedstawiona metoda wykazująca powtarzalne wyniki przez lata jest oparta na metodzie opublikowanej przez Smith et al. (2001) i Versalovic et al. (1994).

Procedura dotycząca wykonania izolacji DNA i testu PCR została opisana w Załączniku.

**Podziękowania**

Test ten został pierwotnie przygotowany przez Janse J (Dutch General Inspection Service, Holandia).

**Materiały źródłowe**

(zachowana wersja oryginalna)

Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT & de Bruijn FJ (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2286–2295.

EC (1998) COUNCIL DIRECTIVE 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Official Journal of the European Communities L 235/1

Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ & Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology* 5, 25–40.

Rademaker JLW, Louws FJ & de Bruijn FJ (1998) Characterization of the diversity of ecologically

important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.3 /1–3.4.3/27 Kluwer Academic.

Smith NC, Hennesy J & Stead DE (2001) Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *European Journal of Plant Pathology* 107, 739–748.

Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Ditto C, Horng JS & Rossbach S (2001) Phylogenetic studies on *Corynebacterium bovis* isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* 84 , 2419–2423.

## Załącznik

### Izolacja DNA

1. W 1,5 ml probówce Eppendorfa zawiesić 1/3 pełnej ezy bakterii z 48-72 godzinnej kultury na podłożu z agaru odżywczego (NA) lub z agaru drożdżowo-glukozowo-peptonowego (YPGA) w 100  $\mu$ l wody wolnej od R/DNA-zy (około  $10^9$  kom./ml). Można użyć innego odpowiedniego nie selektywnego podłoża. Pod warunkiem, że działanie podłoża i wybranej metody zostało sprawdzone w laboratorium, rep-PCR powinien być przeprowadzony ściśle wg wybranych standaryzowanych metod aby otrzymać powtarzalne wyniki i wiarygodną bazę rep-PCR „odcisk palca”.

2. Zworteksować w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny.

3. Wykonać lizę bakterii i ekstrakcję DNA, najlepiej przy użyciu zestawu do ekstrakcji dostępnego w handlu jak np. Roche High Pure PCR Template Preparation Kit lub Biorad's Chelex 100 kit. Procedury ekstrakcji dla obu zestawów zostały przedstawione w tym protokole. Ekstrakcję DNA możliwa także wykonać przez ogrzewanie zawiesiny bakterii przez 15 min. w temperaturze 95°C, a następnie szybkie ochłodzenie na lodzie i usunięcie zanieczyszczeń poprzez wirowanie przez 5 min. przy 7000g i użycie supernatantu.

#### 3a) Zestaw -Roche High Pure PCR Template Preparation Kit

##### Zasada

- Komórki bakteryjne poddawane są procesowi lizy podczas krótkiej inkubacji z lizozymem w proteinazie K i wszystkie nukleazy zostają poddane inaktywacji przy użyciu guanidyny-HCl.
- Kwasy nukleinowe wiążą się wybiórczo z włóknami szklanymi zawartymi w probówce filtrującej (High Pure purification filter tube).
- Związane kwasy nukleinowe są płukane za pomocą buforu usuwającego inhibitory w celu usunięcia składników powodujących inhibicję testu PCR.
- Związane kwasy nukleinowe poddawane są płukaniu za pomocą buforu płuczącego w celu usunięcia soli, białek oraz innych składników komórki powodujących kontaminację.
- Oczyszczone kwasy nukleinowe są odzyskiwane z włókien szklanych przy użyciu buforu do wmywania o niskiej zawartości soli.
- Oczyszczone DNA może zostać następnie użyte do reakcji (rep)PCR, trawienia restrykcyjnego lub amplifikacji długich fragmentów polimorficznych (AFLP).

##### Bufory, i inne

- Zestaw do izolacji Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Nr katalogowy 1 796 828)
- Roztwór lizozymu (10 mg/ml lizozymu w 10 mM Tris– HCl, pH 8.0)
- Izopropanol
- Woda wolna od R/DNA-zy

### *Procedura*

Uwaga: Bufor wymywający ogrzać do temp. 70°C

1. Za pomocą pipety przenieść do probówki 1,5 ml 200 µl ekstraktu zawiesiny bakterii w wodzie wolnej od R/DNA-zy.
2. Dodać 5 µl roztworu lizozymu (10 mg/ml lizozymu w 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) i inkubować 15 min. w temperaturze 37°C.
3. Dodać 200 µl buforu wiążącego i 40 µl proteiny K szybko wymieszać i inkubować przez 10 min. w temp. 70°C.
4. Dodać 100 µl izopropanolu i dokładnie wymieszać.
5. Za pomocą pipety przenieść próbkę do górnego zbiornika złożonej probówki odbierającej z filtrem.
6. Wirować w mikrowirówce przez 1 min, przy prędkości 8000 rpm.
7. Wyrzucić probówkę odbierającą z zawartością. Połączyć probówkę filtrującą z nową probówką odbierającą i dodać 500 µl buforu usuwającego inhibitory.
8. Wirować przez 1 min. przy prędkości 8000 rpm.
9. Wyrzucić probówkę odbierającą z zawartością. Połączyć probówkę filtrującą z nową probówką odbierającą i dodać 500 µl buforu płuczającego.
10. Wirować przez 1 min. przy prędkości 8000 rpm.
11. Wyrzucić probówkę odbierającą z zawartością. Połączyć probówkę filtrującą z nową probówką odbierającą i dodać 500 µl buforu płuczającego.
12. Wirować przez 1 min. przy prędkości 8000 rpm.
13. Wyrzucić probówkę odbierającą z zawartością. Połączyć probówkę filtrującą z nową probówką odbierającą.
14. Wirować przez 10 s przy prędkości 14 000 rpm w celu usunięcia pozostałości buforu płuczającego.
15. Umieścić probówkę z filtrem w czystej probówce reakcyjnej o poj. 1.5 ml.
16. Dodać 200 µl buforu do elucji, który był wcześniej ogrzany do 70°C.
17. Wirować przez 1 min. przy prędkości 8000 rpm.
18. Usunąć probówkę z filtrem. Zawartość probówki reakcyjnej zawiera DNA.
19. Zawiesina DNA może być użyta bezpośrednio lub przechowywana w stanie zamrożonym w temp. - 20°C lub - 80°C

### *Uwagi*

- Probówki z roztworem lizozymu i proteiny K należy trzymać na lodzie w celu uniknięcia zmniejszenia aktywności enzymu.
  - Roztwór lizozymu jest przechowywany w porcjach przygotowanych do jednorazowego użycia w temp. -20°C.
- Nie zużyte roztwory są wyrzucane.

### *3b) Chelex 100 kit*

Rozpuścić 1,5 g Chelex 100 (BioRad 142-2832) w 25 ml wody wolnej od R / DNA-zy (nie w buforze Tris-EDTA) aby otrzymać 6% roztwór, który może być użyty bezpośrednio lub przechowywany po autoklawowaniu.

Pipetę 1-ml użyć do rozdzielania Chelex, który jest zawarty w zawieszynie poddanej wytrząsaniu z umiarkowaną prędkością.

1. Przygotować 1 ml zawiesiny bakterii o gęstości pomiędzy OD 650 wynoszącej 0,1–0,2 i odwirować w mikrowirówce przez 5 min. przy prędkości 10 000 g.
2. Usunąć ostrożnie supernatant przy użyciu pipety.
3. Zawiesić osad w 300 µl zawiesiny Chelex (zobacz powyżej) poprzez worteksowanie i inkubować w łaźni wodnej przez 20 min. w temp. 56°C.

4. Worteksować przy największej prędkości przez 10 s. Ogrzewać mikro próbówki w bloku grzejnym w temp. 100°C przez 8 min. Uwaga: Obciążyc wieczka w celu uniknięcia ich otwarcia (gwałtownie) podczas gotowania.
5. Worteksować próbówki z dużą prędkością przez 10 s, i natychmiast oziębic na lodzie.
6. Wirować próbówki przez 5 min. z prędkością 14000 g. Przenieść ostrożnie 200 µl supernatantu do nowej próbówki mikrowirówkowej.
7. Użyć objętość 2 µl zawiesiny jako szablon DNA.

## Warunki PCR

### B1) PCR Warunki reakcji BOX-PCR

#### Startery

Materiały źródłowe: Smith et al. (2001) i Versalovic et al. (1994)

Przedni: BOXAIR 5'-CTA.CGG.CAA.GGC.GAC.GCT.GAC.G-3'

Tylny: Przedni = Tylny

Produkt: 100–3500 pz

Warunki reakcji BOX-PCR : Denaturacja wstępna w temp. 95°C przez 7min. Następnie 30 cykli (w 94°C przez 1 min., w 53°C przez 1min.,65°C przez 8 min.) i końcowy etap w temp. 65°C przez 16 min. przed ochłodzeniem w temp. 4°C.

#### Mieszanina reakcyjna

Dla reakcji o objętości 25µl	Dla pojedynczej reakcji (µl)	Dla reakcji (µl)	Stężenie końcowe
Woda wolna od R/DNA	17,55	17,55	
Bufor reakcyjny (10X, Invitrogen)	2,50	2,50	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen)	0,75	0,75	1,5 mM
mieszanina dNTP (10 mM każdego, Promega)	0,50	0,50	0,2 mM
BOX AIR (20 µM)	2,50	2,50	2 µM
Platinum Taq (5U/µl, Invitrogen)	0,20	0,20	1 U
Ekstrakt DNA	2,00	-	
Razem	25,00	23,00	

### B1) PCR Warunki reakcji ERIC-PCR

#### REP-PCR

##### Startery

Materiały źródłowe: Smith et al. (2001); Versalovic et al. , 1994

Przedni: REP1R-1 5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3'

Tylny: REP2-1 5'-ICG ITT ATC IGG CCT AC-3'

I = Inozyna.

Warunki reakcji REP-PCR: wstępna denaturacja w temp. 94°C. Następnie 35 cykli (w temp. 95°C przez 7 min., w temp. 40°C przez 1 min., w temp. 65°C przez 8 min) i etap końcowy w temp. 65°C przez 16 min. Przed ochłodzeniem do temp. 4°C.

#### Mieszanina reakcyjna

Dla reakcji o objętości 25µl	Dla pojedynczej reakcji (µl)	Dla reakcji (µl)	Stężenie końcowe
Woda wolna od R/DNA	15,05	15,05	
Bufor reakcyjny (10X, Invitrogen)	2,50	2,50	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen)	0,75	0,75	1,5 mM
mieszanina dNTP (10 mM każdego, Promega)	0,50	0,50	0,2 mM
ERIC1R	2,50	2,50	2,0 µM
ERIC2	2,50	2,50	2,0 µM
Platinum Taq (5U/µl, Invitrogen)	0,20	0,20	1 U
Ekstrakt DNA	2,00		
Razem	25,00	23,00	

#### B3) PCR warunki reakcji ERIC-PCR

##### Startery

Materiały źródłowe: Smith *et al.* (2001) i Versalovic *et al.* (1994)

Przedni: ERIC1R 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'

Tyłny: ERIC2 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'

Warunki reakcji ERIC-PCR : wstępna denaturacja w temp. 95°C przez 7 min. następnie 30 cykli (w temp. 94°C przez 1 min., w temp. 52°C przez 1min., w temp. 65°C przez 8 min) etap ostatni w temp. 65°C przez 16 min. przed ochłodzeniem do temp. 4°C.

#### Mieszanina reakcyjna

Dla reakcji o objętości 25µl	Dla pojedynczej reakcji (µl)	Dla reakcji (µl)	Stężenie końcowe
Woda wolna od R/DNA	15,05	15,05	
Bufor reakcyjny (10X, Invitrogen)	2,50	2,50	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen)	0,75	0,75	1,5 mM
mieszanina dNTP (10	0,50	0,50	0,2 mM

mM każdego, Promega)			
REP1R-1(20 µM)	2,50	2,50	2,0 µM
REP2-1(20 µM)	2,50	2,50	2,0 µM
Platinum Taq (5U/µl, Invitrogen)	0,20	0,20	1 U
Ekstrakt DNA	2,00	-	
Razem	25,00	23,00	

## Elektroforeza

1. Przygotować żel agarozowy o stężeniu 2% o długości minimum 20 cm.
2. Dodać 6 g agarozy do 300 ml buforu 1xTBE w butelce o pojemności 0,5–1,0 l. Rozpuścić agarozę w mikrofalówce.
3. Umieścić tacę do żelu w aparacie do elektroforezy i wybrać odpowiedni grzebień.
4. Ochłodzić rozpuszczoną agarozę pod bieżącą wodą wodociągową do takiej temperatury aby można dotknąć ręką.
5. Wylać rozpuszczoną agarozę na tacę do żelu, usunąć pęcherzyki powietrza za pomocą jednorazowej końcówki do pipet i umieścić w żelu grzebień.
6. Umyć natychmiast butelkę/kolbę Erlenmeyera za pomocą gorącej wody w celu usunięcia pozostałości agarozy.
7. Pozostawić agarozę do zestalenia (minimum 20 min.).
8. Usunąć grzebień kiedy żel zostanie uformowany. Umyć ostrożnie grzebień za pomocą gorącej wody.
9. Zanurzyć żel w aparacie do elektroforezy w buforze 1x TBE.
10. Wymieszać 6-10 µl próbki PCR z 1–2 µl buforu obciążającego na kawałku parafilmu i obciążyć żel; obciążyć drabinkę 1 kb (rozpuszczone 2 µl drabinki Invitrogen i 4 µl wody) w podobnych ilościach..
11. Żel puścić w pomieszczeniu o niskiej temperaturze przy stałym napięciu 90 V (przez około 2,5 godziny). Odpowiada to 6V/cm, mnożąc przez odległość pomiędzy elektrodami.
12. Wybarwić żel przez 40 min. w roztworze bromku etydyny w stężeniu 0,6 mg/ml w około 400 ml buforu 0,5 x TBE, i odbarwić przez 30 min. w wodzie destylowanej lub buforze 0,5 x TBE (dla zmniejszenia tła).
13. Wykonać wizualizację i dokumentację prążków na żelu w świetle UV, przy użyciu odpowiedniego sprzętu dokumentującego żel.
14. „Odciski palca” (wzór prążków) można porównać wzrokowo i sprawdzić podobieństwo, wzór może być również przedstawiony w postaci pików i porównany przy użyciu oprogramowania komputerowego do testów Rep-PCR dla identyfikacji bakterii takiego jak Bionumerics (Applied Maths NV, Belgia) lub program porównujący dla większej ilości wyszukanych wzorów do analizy i porównania szczepów. Programy te zazwyczaj są w stanie tworzyć biblioteki „odcisków palca” rep-PCR-u. Identyfikacja powinna mieć miejsce na podstawie podobieństwa do bazy wzorów kontroli/szczepów referencyjnych analizowanych w tym samym badaniu w innych badaniach i/lub z danymi w bibliotece.
15. W przypadku użycia wyposażenia do wykonywania zdjęć (np. Kodak DC290), należy zachować je w formacie TIF z odpowiednim stopniem rozdzielczości umożliwiającym podzielenie się „odciskami palca” z innymi laboratoriami posiadającymi biblioteki „odcisków palca” lub z takimi platformami jak Bionumerics aby zwiększyć bazę danych i analizę tych danych.

## Bufory

Bufor (TBE) Tris-borate-EDTA (TBE) na podstawie Sambrook i Russell, 2001

---

### 5x roztwór wyjściowy, 1 l

---

Tris base	54 g
Kwas borowy	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
pH 8,3	

---

Autoklawować lub filtrować przy użyciu filtrów 0,22 lub 0,45µm filtry opóźniają wytrącanie. Bufor 10xTBE może ulec wytrąceniu. Wartość pH roztworu wyjściowego będzie wynosić około pH 8,3 (nie ustalać pH). W przypadku gdy wystąpi wytrącenie należy umieścić butelkę w gorącej wodzie do chwili usunięcia wytrącenia.

Roztwór 0,5x TBE: 45 mM Tris-borate  
1mMEDTA

### Przygotowanie buforu obciążającego

---

Bromofenol blue (10% roztwór wyjściowy)	
Bromofenol blue	5 g
Woda destylowana (bidestylowana)	50 ml
Bufor obciążający	
Glicerol (86%)	3,5 ml
Roztwór bromofenolu blue	300 µl
Woda destylowana (bidestylowana)	6,2 ml

---

(Z Dyrektywy UE 98/57/WE dotyczącej *Ralstonia solanacearum*)

lub:

0,25% bromofenol blue

40% w/obj. roztwór sacharozy w wodzie

Według Sambrook i Russell,2001

Materiały źródłowe

Sambrook J. i Russell D.W. (2001) Podręcznik laboratoryjny - *Molecular cloning: a laboratory manual*. Wydawnictwo - Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA