


|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 1 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

## STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI FYTOPLAZEM METODOU PCR

### 1 Účel a rozsah

Postup slouží k detekci fytoplazem v rostlinném materiálu. Fytoplazmy jsou obligátní intracelulární patogeny, které vyvolávají řadu významných chorob zemědělských plodin, např. stolbur brambor, proliferaci jabloně, chřadnutí hrušně nebo evropskou žloutenku peckovin.

### 2 Princip

Základem této metody je homogenizace rostlinného materiálu, extrakce DNA ze vzorku, amplifikace vyextrahované DNA pomocí PCR a vyhodnocení amplifikovaných fragmentů pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. K extrakci DNA i vlastnímu stanovení fytoplazem se použijí komerční kity. Výsledky se vyhodnotí za použití systému kontrol a ve srovnání s pozitivním materiálem, který je součástí detekčních kitů.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Pufr Dellaporta.

1.1 Hydrogenfosforečnan draselný trihydrát.

1.2 Dihydrogenfosforečnan draselný.

1.3 Bovine serum albumin frakce V.

1.4 Polyvinylpyrrolidon.

1.5 Kyselina askorbová.


1.6 Sacharóza.

Příprava: viz Postup, bod 5.1.

2 DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit, (Qiagen), pro izolaci celkové DNA z rostlinných buněk a tkání.

2.1 Buffer AP1.

2.2 Buffer P3.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 2 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

2.3 Buffer AW1, před prvním použitím se ředí (95 – 100)% etanolem dle návodu výrobce kitu.

2.4 Buffer AW2, před prvním použitím se ředí (95 – 100)% etanolem dle návodu výrobce kitu.

2.5 Buffer AE.

2.6 RNase A.

Součástí kitu je také tento spotřební materiál

2.7 DNeasy Mini Spin Columns.

2.8 QIAshredder Mini Spin Columns.

2.9 Collection Tubes (sběrné zkumavky) o objemu 2 ml.

3 Kit Universal Phytoplasma, (Loewe)

3.1 Premix Universal Phytoplasma (směs primerů a dNTPs).

3.2 Pozitivní kontrola (DNA nakažené rostliny).

3.3 Negativní kontrola (DNA zdravé rostliny).

4 iTaq™ DNA Polymerase, (Biorad)

4.1 Taq polymeráza 5 U/μ.

4.2 10 × iTaq™ Buffer (Polymerase buffer).

4.3 Roztok MgCl<sub>2</sub> (je součástí kitu).

5 Voda vhodná pro PCR.

6 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

7 Agaróza pro molekulární biologii.

8 Etanol denaturovaný, 70%.


9 Etanol (95 – 100)% pro UV spektroskopii.

10 Hydroxid sodný, c(NaOH) = 1 mol/l.

Příprava: 10 g NaOH se rozpustí ve vodě (6) a po vytemperování se doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

11 Na<sub>2</sub>EDTA – disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové.

Příprava: viz Postup, bod 5.2.1.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 3 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

12 Trizma base.

Příprava: viz. Postup, bod 5.2.2.

13 Ledová kyselina octová.

14 Ethidiumbromid zásobní roztok, 1%.

Příprava: Zásobní roztok ethidiumbromidu (14) se dodává komerčně. Pracovní roztok se získá zředěním zásobního roztoku 10 × vodou (6). Uchovává se v chladničce.

15 Elektroforetický marker pro amplifikáty, např. EZ Load™ Molecular Ruler 100bp PCR Biorad.

16 Elektroforetický marker pro amplifikáty, např. EZ Load™ Molecular Ruler 500bp PCR Biorad.

17 Elektroforetický hmotnostní marker, např. EZ Load™ Molecular Ruler Precision Mass, Biorad, uchovává se v chladničce.

18 6 × Loading Dye Solution.

19 Dekontaminační roztok.

#### 4 Přístroje a pomůcky

1 Homogenizátor roller.

2 Váhy (předvážky) s přesností 0,01 g.

3 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

4 pH metr.

5 Vodní lázeň, (65 ± 1) °C.

6 Centrifuga chlazená, 14000 ot/min.

7 Vortex.

8 Minicentrifuga.

9 Nízkoobjemový spektrofotometr (vlnové délky 230 nm, 260 nm, 280 nm).


10 Laminární box.

11 Termální cykler.

12 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

13 Elektroforetická vana a zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

14 Fotodokumentační zařízení a software.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 4 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

- 15 Transiluminátor.
- 16 Přenosná UV lampa.
- 17 Automatické pipety s nastavitelným objemy (0,1 – 1000) µl a špičky s filtrem i bez filtru.
- 18 Skalpely.
- 19 Plastové Petriho misky, 60 mm.
- 20 Plastové zkumavky 0,20 ml, 0,5 ml, 2 ml, 50 ml.
- 21 Pasteurovy pipety.
- 22 Výrobník ledu.
- 23 Horkovzdušná sušárna, (115 – 120) °C.
- 24 Lednice.
- 25 Mrazicí box –20 °C, –80 °C pro dlouhodobé skladování.
- 26 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, parafilm, buničitá vata, nádoba na uchování ledu.
- 27 Filtrační papír vysoké hustoty, např. Whatman Grade 1.

### Poznámky

- 1 *Sterilizace a dekontaminace se provádí dle charakteru materiálu buď tepelně v sušárně 1 h při (115 – 120) °C nebo chemicky např. 70% etanolem, (0,5 – 1)% chlornanem sodným apod.*

## 5 Postup


### 5.1 Příprava pufru Dellaporta

43,4 g hydrogenfosforečnanu draselného (1.1), 8,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (1.2), 200 g sacharózy (1.6), 3 g séra (1.3) a 40 g polyvinylpyrrolidonu (1.4) se rozpustí ve sterilní vodě (6) a doplní do objemu 2 l. Takto připravený roztok se uchovává při –20 °C. Před použitím k homogenizaci rostlinného materiálu se rozpustí a přidá se kyselina askorbová (1.5) v množství 1,06 g/200 ml pufru. Pomocí NaOH (10) se upraví pH na 7,6. Do druhého dne se spotřebuje. Pufir se používá vytemperovaný na teplotu 4 °C.

### 5.2 Příprava zásobního roztoku 50 × TAE

#### 5.2.1 Příprava 0,5M zásobního roztoku EDTA

Naváží se 186,1 g Na<sub>2</sub>EDTA (11) na 1000 ml vody (6). Navážka se vmíchá do (750 – 800) ml vody (6). pH se upraví na 8,5 přidáním NaOH (10). Potom se doplní vodou (6) do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes filtrační papír vysoké hustoty. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 5 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

### 5.2.2 Příprava 2M Tris

Naváží se 242 g Trizma base (12) a rozpustí se v 650 ml vody (6). Přidá se 57,1 ml ledové kyseliny octové (13) a 100 ml předem připraveného 0,5M zásobního roztoku EDTA (viz 5.2.1). Doplní se vodou (6) do celkového objemu 1000 ml. Neautoklávuje se. Uchovává se v těsně uzavřené lahvi při laboratorní teplotě.

### 5.2.3 Příprava pracovního roztoku 1 × TAE pro elektroforézu

Odměrným válečkem se odměří 20 ml zásobního roztoku 50 × TAE (viz. 5.2.2), nalije se do 1000ml odměrného válce a doplní se vodou (6) do objemu 1000 ml.

## 5.3 Příprava agarózového gelu

Používá se 1% gel pro stanovení kvality vyizolované DNA - 0,8 g agarózy (7) a 80 ml 1 × TAE pufru (viz 5.2.3) a 1,5% gel pro hodnocení amplifikačních fragmentů - 1,2 g agarózy (7) a 80 ml 1 × TAE pufru (viz 5.2.3). Do Erlenmeyerovy baňky se naváží dané množství práškové agarózy (7) s přesností na 0,1 g a přidá se 80 ml pracovního 1 × TAE pufru (viz 5.2.3). Vaří se při (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle asi (15 – 20) min, až se roztok úplně vyčeří a vzduchové bubliny vymizí i po krouživém zamíchání. Zatím se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek a vyrovná se vodováhou. "Zuby" hřebínku vytvoří v tuhoucím gelu jamky konstantní velikosti.


Po mírném zchladnutí se přidá 10 µl pracovního roztoku ethidiumbromidu (14), který slouží jako interkalační barvivo ke zviditelnění DNA v gelu, a míchá se 1 min. Poté se vyjme míchadélko a rozvařená agaróza se nalije do vany s hřebínkem. Nechá se přibližně 15 min zchladnout při laboratorní teplotě. Poté se pro dokonalé ztuhnutí umístí gel na 30 min do lednice. Asi po (20 – 30) min, v závislosti na teplotě prostředí, lze opatrně vyjmout hřebínek a přenést gel z nalévací vany do elektroforetické vany s pracovním roztokem TAE pufru (viz 5.2.3). Tuhnutí lze urychlit přenesením vany s částečně ztuhlým, přenosu schopným gelem, do chladničky.

## 5.4 Homogenizace rostlinného materiálu

Pro diagnostiku fytoplazmových onemocnění se používá čerstvý rostlinný materiál. Jako vzorek se používají cévní svazky listů (středové žilky) a lýko z větví. Vzhledem k citlivosti patogenů na vyšší teplotu se pracuje v klimatizované místnosti při (16 – 18) °C. Vzorky, spotřební materiál (zkumavky, Petriho misky) a pufr se před použitím uchovávají v chladničce.

### Postup homogenizace

Do Petriho misky se nastříhají středové žilky listů a naškrábe lýko (cca 2 g). Přelije se 5 ml vychlazeného pufru (viz 5.1). Materiál se potom vloží do homogenizátoru roller. Během homogenizace se přelije dalšími cca 15 ml pufru (viz 5.1) a ten se sbírá do vychlazené 50ml zkumavky. Inkubuje se 10 min na ledu nebo v lednici. Pak se vzorek centrifuguje 4 min v předem vychlazené centrifuze při 1000 g při 4 °C. Supernatant se slije do nové vychlazené 50ml zkumavky. Centrifugací se odstraní hrubý balast. Dále se centrifuguje 25 min při 10000 g při 4 °C. Supernatant se vylije a získaný pelet se použije pro izolaci DNA.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 6 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

## 5.5 Izolace DNA

### 5.5.1 Obecné zásady pro izolaci DNA

Během celého postupu je naprosto nezbytné pečlivé zacházení se vzorky, aby se zamezilo kontaminaci jednoho vzorku stopami druhého, např. mikrokapenkami DNA, které se mohou uvolnit při pipetování a otvírání zkumavek, dotekem víček zkumavek jedné po druhé apod. Proto je třeba přizpůsobit veškeré operace prevenci kontaminace.

- Vyhnout se nevhodným pohybům a dotekům, všechny operace vykonávat v rukavicích a rukavice po každém kroku nebo kdykoli je třeba i uvnitř kroků vyměnit, nebo alespoň dekontaminovat opláchnutím v dekontaminačním roztoku (70% etanol nebo roztok chlornanu sodného) a vodou (6).
- Používat sterilní materiál.
- Dojde-li k ukápnutí tekutiny, která obsahuje nebo by mohla obsahovat DNA, je nutno ji okamžitě vysát buničitou vatou a potřísněný povrch otřít vatou s dekontaminačním roztokem, 70% etanolem nebo roztokem chlornanu sodného. Vata se přidá k DNA odpadu.
- Do každého běhu izolace DNA, a to vzorků i standardů, je nutno zařadit slepý vzorek bez rostlinného materiálu, který dále postoupí PCR-detekci pro ověření čistoty reagensů a případné kontaminace vzorků.

### 5.5.2 Postup izolace DNA

K izolaci DNA se používá komerční kit DNeasy® Plant Mini Kit (2).


Připraví se pracovní plocha: Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od molekul DNA otřením povrchů dekontaminačním roztokem, 70% etanolem (8) a UV zářením po dobu 30 min. Ke koncentrátům pufrů AW1 (2.3) a AW2 (2.4) se přidá etanol (9) v množství uvedeném na lahvičce pufru. Po zředění se na lahvičku vyznačí přidání etanolu (9).

#### Buněčná lyze

Do 50ml zkumavky s peletem z rostlinného materiálu (viz bod 5.4 Homogenizace) se pipetuje 800 µl pufru AP1 (2.1) a řádně se promíchá. Poté se přenesou Pasteurovou pipetou 2 × 500 µl této suspenze do dvou čistých 2ml zkumavek typu eppendorf. Tímto se získají z jednoho homogenizovaného vzorku dva vzorky paralelní, které se využijí k detekci fytoplazem. Do každé zkumavky se přidají 4 µl RNázy A (2.6). Obsah zkumavek se krátce promíchá na vortexu. Inkubuje se 10 min při 65 °C ve vodní lázni. Během inkubace se vzorky 2 × až 3 × promíchají. Tímto krokem se získá buněčný lyzát.

#### Vysrážení zbytků

K buněčnému lyzátu se přidá 130 µl pufru P3 (2.2), promíchá se a inkubuje se 5 min na ledu (vysrážení bílkovin, polysacharidů). Centrifuguje se 5 min při 14000 ot/min a teplotě centrifugy 20 °C. Supernatant se pipetuje do QIAshreddes Mini spin kolonek (fialové) (2.8),

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 7 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

kteřé jsou umístěny ve sběrných 2ml zkumavkách a centrifuguje se 2 min při 14000 ot/min a teplotě centrifugy 20 °C.

### Vázání DNA

Proteklá tekutina se přenese do nové 2ml zkumavky a přidá se 750 µl pufru AW1 (2.3). Promíchá se opakovaným pipetováním. Napipetuje se 650 µl vzniklé směsi do kolonek DNeasy Mini spin (bílé), (2.7) umístěných ve sběrných zkumavkách. Centrifuguje se při 8000 ot/min a teplotě centrifugy 20 °C. Proteklá tekutina se vylíje. Zopakuje se předchozí krok se zbytkem směsi.

### Promývání DNA

DNeasy Mini spin kolonky se přemístí do nových sběrných zkumavek a přidá se 500 µl pufru AW2 (2.4). Centrifuguje se 1 min při 8000 ot/min a teplotě centrifugy 20 °C. Proteklá tekutina se vylíje. Znovu se přidá 500 µl pufru AW2 (2.4) a centrifuguje se 2 min při 14000 ot/min a teplotě centrifugy 20 °C.

### Eluce DNA

Kolonky DNeasy Mini spin se přemístí do nových zkumavek a přesně na membránu se napipetuje 100 µl pufru AE (2.5). Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě a poté se centrifuguje 1 min při 8000 ot/min a teplotě centrifugy 20 °C. V proteklé tekutině se nachází vyizolovaná DNA.

## 5.6 Měření koncentrace a kvality vyizolované DNA


Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické stanovení její koncentrace, případně dalších příměsí a zjištění její kvality – celistvosti pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu.

### Spektrofotometrické měření koncentrace a poměry čistoty vyextrahovaného vzorku

Měření při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm umožní stanovení koncentrace získané DNA i hodnocení čistoty vzorku. Koncentrace nukleových kyselin se počítá na základě absorbance vzorku při 260 nm. Předpokladem pro její správné určení je čistota vzorku. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbancí naměřených při 260 nm a 280 nm a 260 nm a 230 nm. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm.

260/280

Při poměru hodnot  $A_{260/280} \sim 1,8$  se považuje vzorek vyextrahované DNA za čistý. Hodnoty poměru absorbancí 260/280 se nejčastěji pohybují v rozmezí (1,7 – 2,0). Nízké hodnoty tohoto poměru většinou indikují, že je vzorek kontaminovaný proteiny nebo reagenциemi, jako je např. fenol, nebo že vzorek obsahuje nízkou koncentraci DNA ( $< 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ). Vysoké hodnoty problém neindikují, protože vyextrahovaná DNA může kromě dvouvláknové DNA obsahovat DNA jednovláknovou, volné nukleotidy a RNA. Jedná se o látky, které absorbují při 260 nm.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 8 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

260/230

Hodnoty 260/230 pro čisté nukleové kyseliny bývají většinou vyšší než hodnoty 280/260, a to v rozmezí (2,0 – 2,2). Hodnoty odlišující se od tohoto rozmezí indikují buď problém se vzorkem, nebo s extrakčním postupem, proto je důležité brát v úvahu jak hodnoty nižší než 2,0, tak i hodnoty nad 2,2. Nízké hodnoty uvedeného poměru mohou být způsobeny přítomností sacharidů, zbytkového fenolu z izolace DNA a zbytků guadininu, který je součástí izolačních kolonek. Vysoké hodnoty tohoto poměru mohou být způsobeny špatným postupem měření koncentrace a kvality.

### Vlastní měření

Koncentrace DNA se měří proti slepému vzorku, kterým je roztok, v němž je rozpuštěná. Ve většině případů se tedy jedná o eluční pufr použitého izolačního kitu. Použijí se 2  $\mu$ l vzorku. Každý vzorek se měří dvakrát. Z naměřených hodnot se vypočítá průměr. Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje koncentrace (10 – 20) ng/ $\mu$ l templátové DNA. Pokud je její koncentrace vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR (5) podle níže uvedeného vztahu. Snížením koncentrace DNA se sníží i koncentrace případných inhibitorů reakce, které mohou být ve vzorku přítomny.

$$d = (x \times y) / z \quad v = x - d$$

- x požadované množství naředěné DNA ( $\mu$ l),
- y požadovaná koncentrace DNA (ng),
- z změřená koncentrace DNA (ng/  $\mu$ l),
- d množství námi vyextrahovaného vzorku potřebného pro přípravu x  $\mu$ l roztoku o koncentraci DNA z ( $\mu$ l),
- v množství PCR vody potřebné pro ředění vyextrahované DNA na požadovanou koncentraci.

## 5.7 Polymerázová řetězová reakce


### Příprava reakční směsi

Pracuje se na ledu a sterilně podle stejných zásad tak, jak se uvádí v Postupu, bod 5.5.1. Připraví se PCR box: pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od molekul DNA otřením povrchů dekontaminačním roztokem, 70% etanolem (8) a UV zářením po dobu 30 min.

Stanoví se počet reakcí (počet vzorků plus příslušné kontroly – beztemplátová, negativní a pozitivní). Podle tabulky 1 se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Výsledný objem celkové reakční směsi je 27,6  $\mu$ l (včetně templátové DNA).

Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí: voda vhodná pro PCR (5), premix Loewe (3.1), pufr (4.2),  $MgCl_2$  (4.3) a polymeráza (4.1). Tato směs bez templátu se rozpipetuje po množstvích stanovených v tabulce 1 do přichystaných amplifikačních zkumavek.



|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 9 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3 |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1 |

Nakonec se do každé zkumavky přidá 2,5 µl templátové DNA (viz 5.6.2). Pro beztemplátovou kontrolu se místo templátové DNA přidá tentýž objem vody vhodné pro PCR (5). Pipetuje se v následujícím pořadí: 1. beztemplátová kontrola, 2. negativní kontrola (3.3), 3. vzorky a 4. pozitivní kontrola (3.4).

Amplifikační zkumavky s dobře utěsněným víčkem se vloží do jamek v bloku termocyklieru a spustí se příslušný program, který uvádí výrobce kitu (tabulka 2).

**Tabulka 1. Příprava PCR.**

| Složka                              | 1 reakce (µl) |
|-------------------------------------|---------------|
| <b>Voda (5)</b>                     | 16            |
| <b>Premix Universal</b>             | 5             |
| <b>Polymerase Buffer</b>            | 2,5           |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>             | 1,5           |
| <b>Taq Polymerase</b>               | 0,1           |
| <b>Templát</b>                      | 2,5           |
| <b>Reakční směs včetně templátu</b> | 27,6          |

### Poznámky

2 *Pozitivní a negativní kontrola se přidává v množství 1 µl. Zbývající množství do celkového objemu 27,6 µl (tj. 1,5 µl) se doplní vodou vhodnou pro PCR (5).*


## 5.8 Elektroforéza amplifikačních fragmentů v agarózovém gelu

### Nanášení vzorků

Objem vzorku nanášeného do jamky závisí na typu hřebínku. Promyslí se rozvržení vzorků a markerů. Vzorky před nanesením do jamek se barví roztokem 6 × Loading Dye Solution (18). Po nanesení vzorků amplifikátů a markerů (16, 17) se spustí chod elektroforézy ((80 - 100) V, (60 – 75) min).

### Vyhodnocení

Po dostatečném rozdělení fragmentů se vyjme gel z lázně a prosvítí se na transiluminátoru. Provede se fotodokumentace. Snímky se popíší a vyhodnotí.

|   |  |        |    |
|---|--|--------|----|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 10 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         analýza rostlinného materiálu</b>  | Vydání | 3  |
|   | 40300.1 – Stanovení přítomnosti fytoplazem<br>metodou PCR                      | Revize | 1  |

## 6 Hodnocení testu

**Pozitivní kontrola PCR:** vykazuje jasně rozeznatelný pruh v gelu v místě, kde se má hledaný pruh (v porovnání s markerem) vyskytovat.

**Negativní kontrola PCR:** nevykazuje pruh v místě, kde se má hledaný pruh (v porovnání s markerem) vyskytovat.

**Beztemplátová kontrola PCR:** nevykazuje žádný pruh (kromě pruhu či skvrny odpovídající svou polohou primerům, primer-dimerům apod. v oblasti od 20 bp do 100 bp).

Nesplňuje-li daný běh amplifikace tyto podmínky, je nutno jej opakovat s fungujícími kontrolami.

Splňuje-li daný běh amplifikace tyto podmínky, lze říci, že:

**Vzorky negativní** pro daný amplikon jsou vzorky, v jejichž stopách se nevyskytují pruhy v místech, kde, ve srovnání s markerem a pozitivní kontrolou, má ležet hledaný pruh.

**Vzorky pozitivní** pro daný amplikon jsou vzorky, v jejichž stopách se vyskytují pruhy v místech, kde, ve srovnání s markerem a pozitivní kontrolou, má ležet hledaný pruh.

Je-li nález nejednoznačný, zkouška se opakuje.

## 7 Literatura

- 1 Navrátil, Fialová a kolektiv autorů. Fytoplazmy - obligátní intrabuněčné patogeny, Diagnostika fytoplazem a výsledky průzkumu Státní rostlinolékařské správy. *Fytoplazmy významné patogeny rostlin*. 1.vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, 6 - 26, 62 - 67.
- 2 Navrátil, Válová, Fialová, Nečas: Detekce a identifikace škodlivých fytoplazem ovocných dřevin, metodika PCR detekce PřF UP v Olomouci, 2002, 1 – 16.
- 3 Nečas, Krška, Detection of Phytoplasma ESFY in Apricot Trees using Phloem and Petioles, *Plant Protect.Sci.*, 2005, 132 – 140.
- 4 Fialová, Navrátil, Valová, Phytoplasma Occurrence in Apple Trees in the Czech Republic, *Plant Protect. Sci.*, 2003, 7 – 12.
- 5 Data Sheets on Quarantine Pests: Apple proliferation phytoplasma, [www.eppo.org](http://www.eppo.org).
- 6 Uživatelský manuál k přístroji NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer.