

PCR: NĚKTERÉ SOUČASNÉ APLIKAČNÍ MOŽNOSTI MOLEKULÁRNÍ GENETIKY V PIVOVARSKO-SLADAŘSKÉM PRŮMYSLU

RNDr. IGOR KRAUS, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Brno

Klíčová slova: PCR, RAPD, analýza DNA, identifikace odrůd, jarní ječmen

Polymerasová zřetěžená reakce (polymerase chain reaction, dále PCR) patří do kategorie těch metodických nástrojů, které lze bez nadsázky označit přívlastky – jednoduché, elegantní a univerzální. Jde o metodu poměrně mladou, přesto si však našla své místo všude tam, kde potřebujeme odhalit rozdíly mezi jedinci určitého biologického druhu nebo různých druhů, či stanovit specifické vlastnosti konkrétního jedince na úrovni (zpravidla) deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Těmito rozdíly rozumíme délkové odlišnosti v úseku DNA, který je ohraničen oblastmi o známém pořadí nukleotidových bází.

Na tomto místě si dovolueme menší poznámku k historii PCR. V původním protokolu [1] se používala ke katalýze reakce DNA-polymerasa I z bakterie *E. coli*, která ovšem nevykazuje potřebnou stabilitu při nezbytných vyšších reakčních podmínkách. Teplotní stabilita DNA polymerasy je při PCR podmínkou dosti zásadní, a protože PCR je reakcí cyklickou (zpravidla probíhá v 30–45 cyklech), bylo po každém cyklu nutno přidávat novou aktivní polymerasu. Tento nezbytný úkon výrazně prodlužoval celou reakci a nebylo možno uvažovat o nějakých praktických aplikacích. Teprve s objevem termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, resp. purifikací její termostabilní DNA-polymerasy (tzv. Taq DNA-polymerasa) byla časová náročnost PCR vyřešena.

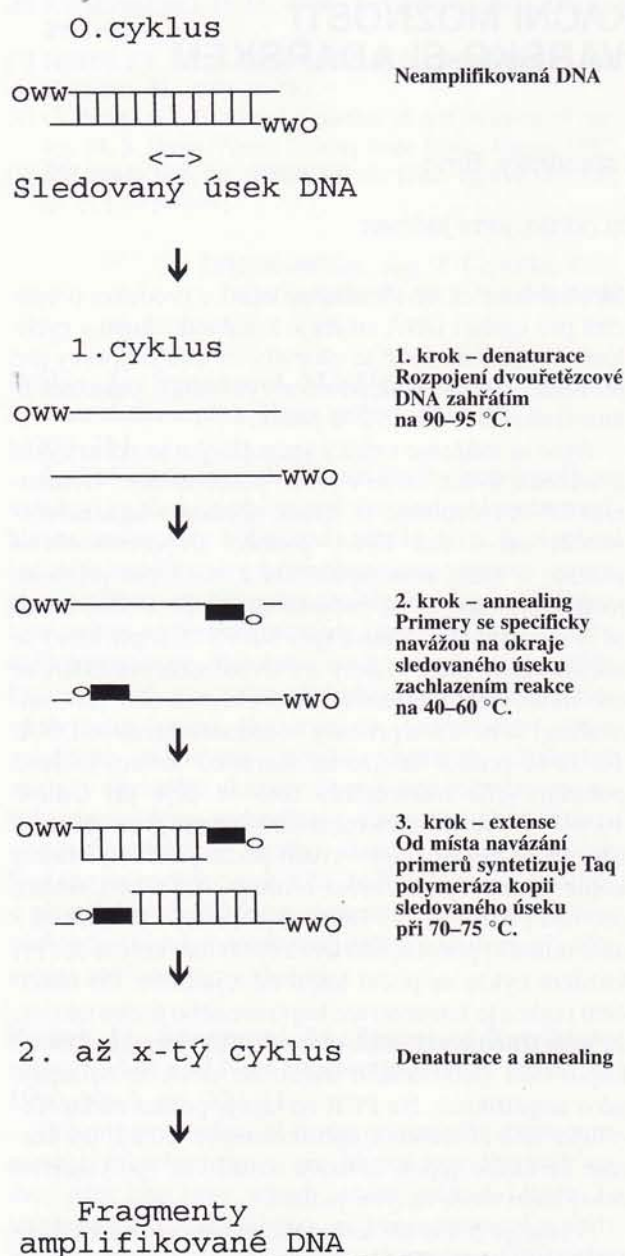
V úvodu byla metoda označena jako jednoduchá a elegantní. Toto tvrzení doložíme popisem jejího principu, který je zřejmý i bez hlubších znalostí molekulární genetiky. PCR probíhá, jak již bylo uvedeno, v několika desítkách cyklů (obr. 1). Každý cyklus obsahuje následující pořadí kroků: 1. denaturace, 2. annealing a 3. extenze. Ještě před zevrubným popisem jednotlivých kroků uvedme, co zásadního reakční směs obsahuje. Jednak je to izolovaná DNA, která slouží jako předloha pro kopírování zkoumaného úseku, dále dva tzv. primery, které zkoumaný úsek na vlákně DNA jednoznačně ohraničí – primer je oligonukleotid sestávající obvykle z 20–30 nukleotidů (nukleotid = základní stavební jednotka genetického kódu; trojmístná kombinace 4 druhů nukleotidů tento kód vytváří). Další složkou reakční směsi je enzym DNA-polymerasa, který podle předlohy syntetizuje kopii sledovaného úseku vymezeného primery a konečně čtyři druhy volných nukleotidů, z kterých DNA-polymerasa syntetizuje kopii sledovaného úseku. Například u ječmene lze využít jako zdroj DNA list, kořeny či zárodek obilky. Metod pro izolaci DNA je nepřeberné množství a používají se speciální modifikace pro konkrétní typ tkáně.

Stručně lze říci, že všeobecný trend v produkci preparátů pro izolaci DNA směřuje k jednoduchosti a rychlosti. V nedávné době se objevily na trhu soupravy pro preparaci DNA například z embrya obilky, které umožňují izolovat DNA do 2–3 hodin.

Nyní se můžeme vrátit k jednotlivým krokům cyklu a můžeme uvést, co se v jejich průběhu děje. Denaturace DNA (předlohy) je nutná, protože v nendenaturovaném stavu má DNA podobu dvouřetězcového vlákna, a takto není způsobilá k navázání primerů, resp. k přístupu DNA-polymerasy na předlohu. Jedná se o denaturaci tepelnou (při 90–95 °C), při které se naruší vazby mezi vlákny a z dvouřetězcové DNA se tak stane jednořetězcová. Ve druhém kroku (tzv. annealing) se navážou primery na jednořetězcovou DNA. To, že se primer naváže na „správné“ místo, je dáno pořadím jeho nukleotidů. Toto se děje při teplotě 40–60 °C. Ve třetím kroku (tzv. extenze) se za katalýzy DNA-polymerasy vytváří podle předlohy vlastní kopie úseku vymezeného primery. Tato část reakce probíhá při 70–75 °C. Jednotlivé kroky cyklu trvají 1 až 2 minuty; počet cyklů bývá zpravidla kolem 35. Při každém cyklu se počet kopií zdvojnásobí. Při ukončení reakce je koncentrace kopírovaného úseku taková, že je možno ho vizuálně stanovit. Toto mnohanásobné kopírování sledovaného úseku na DNA se označuje jako amplifikace. Na PCR navazuje potom elektroforetické dělení těchto amplifikovaných úseků, při kterém se ukáže jejich délková rozdílnost (polymorfismus) mezi sledovanými jedinci.

A jaké je potřebné technické vybavení pro analýzu DNA s využitím PCR? Především to je zařízení pro vlastní PCR, tedy termocyklér (amplifikátor DNA). Dále je nezbytná chlazená odstředivka pro izolaci DNA ze zkoumaného objektu, zařízení pro elektroforézu (zdroj napětí a vana pro horizontální elektroforézu) a vyhodnocování (UV transiluminátor na vizualizaci amplifikovaných úseků DNA rozdělených elektroforézou a fotografické zařízení pro dokumentaci a vyhodnocení výsledků).

Pro názornost je možno uvést několik příkladů aplikací PCR, které se přímo či nepřímo dotýkají oblasti pivovarsko-sladařské. Je to například identifikace bakterií mléčného kvašení [2, 3], rozlišení amerických odrůd sladovnického ječmene, vzájemně neodlišitelných klasickou elektroforézou zásobních bílkovin [4], nebo identifikace odrůd chmele [5]. Dále byla PCR aplikována kupříkladu při stanovování genetické příbuznosti uvnitř a mezi přírodními populacemi *Hordeum spontaneum* s využitím při šlechtění ječmene [6], při ana-



Obr. 1. Amplifikace DNA polymerázovou zřetězenou reakcí (PCR). Soubor tří kroků (denaturace, annealing a extenze) se označuje jako cyklus. Počet kopií sledovaného úseku DNA se po každém cyklu zdvojnásobí. Taq DNA polymerasa je termostabilní a není inaktivována vysokou teplotou, proto mohou být všechny reakční komponenty – templát (předloha DNA), primery, deoxynukleosidtrifosfáty, Taq polymerasa a pufr – smíseny současně na počátku reakce, která potom probíhá jednoduchým cyklickým střídáním teplot v reakční zkumavce v objemech 10^{-2} ml. (Upraveno podle Tsuchiya et al., 1992).

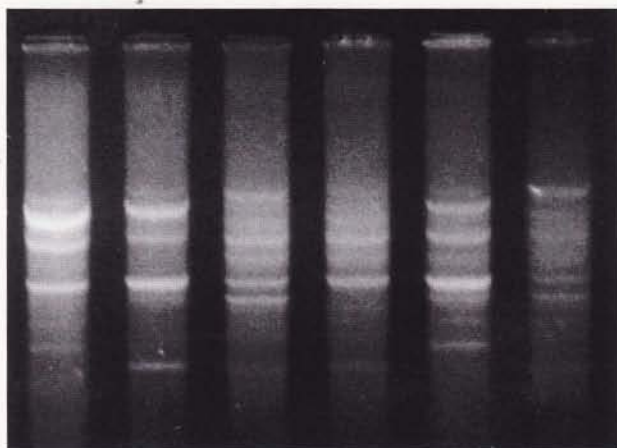
lýzách primární struktury např. genů kódujících β -amylasu, α -amylasu, β -glukanasu, β -hordein a ribozomální podjednotku 5S [7, 8].

Základní princip PCR byl rozvinut do několika modifikací, které mají v molekulární biologii široký dopad. Účelem tohoto příspěvku není výčet a popis jednotlivých aplikačních modifikací, o jedné z nich

je však vhodné se zmínit. Tato modifikace bývá označována jako RAPD (random amplified polymorphic DNA). Přednost RAPD analýzy spočívá v tom, že a priori není nutné znát nukleotidové sekvence ohraničující polymorfnní místa na molekule DNA. Primery pro RAPD jsou totiž komerčně sestavovány tak, že jejich délka (zpravidla 10-mer) a pořadí nukleotidových bází zabezpečují vysokou pravděpodobnost „optimálního“ vyhledávání délkových polymorfismů na vlákně DNA. Jinými slovy: tyto primery se v ne příliš časté frekvenci navážou na vlákně DNA vždy tam, kde „najdou“ odpovídající vazebný protějšek. Délkové polymorfismy odhalené z této analýzy jsou tedy skutečně náhodné – nemůžeme říci, zda takto zjištěné rozdíly jsou v konkrétních genech či oblastech DNA, které nemají kódující smysl. Prvotní náročnost RAPD analýzy je dána nutností testování velkého množství primerů, v nichž se pro daný soubor jedinců vyberou pouze primery informativní, které se pak mohou rutinně používat. RAPD analýza je zejména vhodná pro genetické mapování, fylogenetické populační studie – tedy tam, kde je nutno vzájemně odlišit organismy s vysokým stupněm genetické příbuznosti.

Pokud můžeme srovnávat výhody a nevýhody PCR na příkladu identifikace odrůd ječmene, pak většina „pro“ vyznívá ku prospěchu PCR. Podstatnými výhodami PCR jsou její časová nenáročnost (do druhého dne – podle některých údajů během jednoho dne – lze získat výsledek) a prakticky neomezená možnost při vyhledávání rozdílů na úrovni DNA. Nevýhodami, nikoliv však nepřekonatelnými, jsou vyšší investiční náročnost (nejnutnější vybavení bez odstředivky lze v současnosti pořídit do 250 000 Kč) a vyšší požadavek na odbornou úroveň obsluhy a zejména na její pečlivost.

V roce 1994 byla na brněnském pracovišti VÚPS ve spolupráci s Výzkumným ústavem zdraví dítěte v Brně a Výzkumným ústavem rostlinné výroby v Písešanech započata práce na využití techniky PCR pro identifikaci českých a slovenských odrůd jarního ječmene. Na obrázku 2 je příklad RAPD analýzy některých odrůd sladovnického ječmene. Testování PCR na externím pracovišti bude v letošním roce završeno zavedením této metody pro běžné využívání ve VÚPS Brno v návaznosti na doplnění laboratoře potřebným technickým vybavením. Předpokládáme, že v počátečním období bude otestováno několik desítek primerů na současném sortimentu povolených odrůd sladovnického ječmene tak, aby byly jednoznačně identifikovatelné. Dále bude nutno vyzkoušet několik metod na izolaci DNA a zaměřit se na optimalizaci pro případné rutinní využití v identifikaci odrůd jarního ječmene. Závěrem je vhodné vybědnout ostatní pracoviště ke zvážení možnosti využití PCR při řešení svých problematik (mikrobiologie a chmelářství), aby brněnské pracoviště VÚPS v tomto směru nebylo první a jediné v pivovarsko-sladařském oboru, které tuto techniku používá.



Obr. 2. Elektroforetické rozdělení RAPD produktů při použití oligomeru 5'-GCCGCCACCA-3'. Zleva odrůdy jarního ječmene: Jarek, Heran, Galan, Forum, Donum, Akcent. (Foto autor).

LITERATURA:

- [1] SAIKI, R. K. et al.: Science, **230**, 1985, s. 1350.
- [2] TSUCHIYA, Y. ASBC J., **50**, 1992, 2, s. 64.
- [3] TSUCHIYA, Y., KANO, Y., KOSHINO, S.: ASBC J., **52**, 1994, 3, s. 95.
- [4] CHEE, P. W. et al.: ASBC J., **51**, 1993, 3, s. 93.
- [5] ABBOTT, M. S., FEDELE M. J.: J. Inst. Brew., July–August, **100**, 1994, s. 283.
- [6] DAWSON, I. K. et al.: Molecular Ecology, **2**, 1993, s. 151–159.
- [7] KANAZIN, V., ANANIEV, E., BLAKE, T.: Genome, **36**, 1993, s. 1023.
- [8] TSUCHIYA, Y. et al.: J. Ferment. Bioeng., **79**, 1995, 5, s. 429.

Lektoroval ing. J. Šavel, CSc.
Do redakce došlo 15. března 1996

Kraus, I.: PCR – některé současné aplikační možnosti molekulární genetiky v pivovarsko-sladařském průmyslu. Kvas. prům., **42**, 1996, č. 6, s. 215–217.

Rozvoj poznatků v molekulární biologii nabízí v současnosti nový přístup ke sledování rozdílů mezi organismy a určování jejich vlastností dědičně podmíněných. Jedním z metodických nástrojů jsou metody založené na principu polymerázové zřetěžené reakce (PCR). V příspěvku je uveden princip metody a některé možné aplikace v oblasti sladařsko-pivovarské a obouřech návazných. Dále je uveden příklad využití PCR při identifikaci odrůd sladovnického ječmene českého a slovenského původu.

Kraus, I.: PCR: Some Present Possibilities of Application of Molecular Genetics in Brewing and Malting Industry. Kvas. prům., **42**, 1996, No. 6, p. 215–217.

Progress in knowledge in molecular biology offers in present a new approach to monitoring the difference between organisms and determination of properties conditioned on heredity. One of methodic tools are methods based on polymerase chain reaction (PCR). In the paper is presented principle of the method and some possible applications in the branch of brewing and malting industry and consequential fields. Hereafter there is some example of using PCR for identification of malting barley varieties of Czech and Slovak origin.

Kraus, I.: PCR – Einige gegenwärtige Applikationsmöglichkeiten der Molekulargenetik in der Brau- und Malzindustrie. Kvas. prům. **42**, 1996, Nr. 6, S. 215–217.

Die Entfaltung der Erkenntnisse in der Molekularbiologie bietet gegenwärtig einen neuen Weg zu dem Studium der Unterschiede zwischen den Organismen und zu der Ermittlung ihrer erblich bedingter Eigenschaften. Zu den Instrumenten für diese Zwecke gehören auch die Methoden, die auf dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basieren. In dem Artikel wird das Prinzip sowie auch einige mögliche Applikationen in der Brauerei- und Mälzerei-problematik, sowie auch in den anknüpfenden Bereichen angeführt. Im weiteren wird ein Beispiel der PCR-Applikation bei der Identifikation der Braugerstensorten tschechischer und slowakischer Herkunft beschrieben.

Краус, И. : ПЦР – некоторые современные прикладные возможности молекулярной генетики в пивоваренно-солодовенной промышленности. Квас. прум., **42**, 1996, № 6, стр. 215–217.

Развитие познания в молекулярной биологии в наше время предоставляет новый подход к исследованию разниц организмов и определению их свойств наследственно обусловленных. Одним из методических орудий являются методы, основанные на принципе полимеразной цепиобразующей реакции (ПЦР). В статье приводится принцип метода и некоторые возможности его приложения в области солодовенно-пивоваренной и связанных с ним областях. Далее приводится пример использования ПЦР в целях идентификации разновидностей ячменя для производства солода чешского и словацкого происхождения.