

OPRACOWANIE STARTERÓW DO WYKRYWANIA WIRUSA M ZIEMNIAKA ZA POMOCĄ RT- PCR



Bogumiła Zacharzewska, Krzysztof Treder

IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie
Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii

WSTĘP

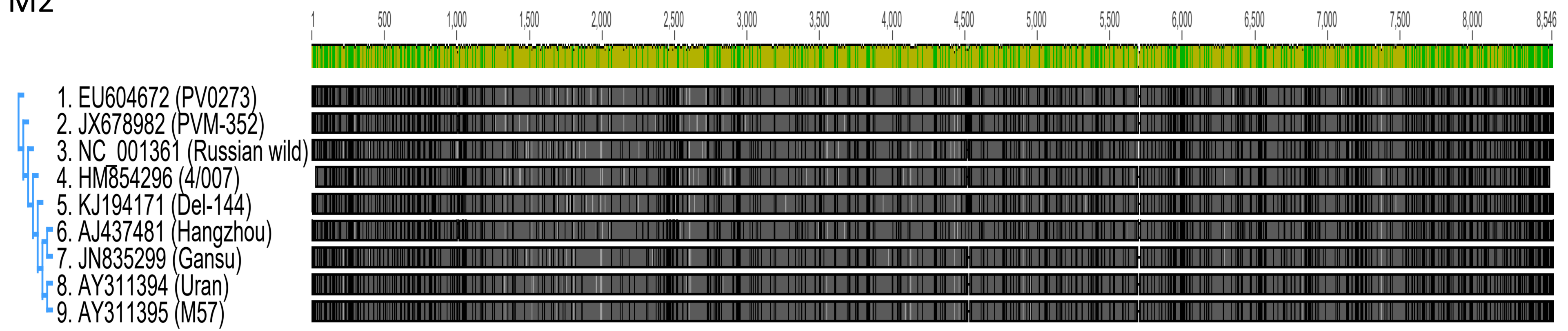
Wirus M ziemniaka (PVM) jest sprawcą mozaiki kędzierzawej ziemniaka i może powodować 30% straty plonu. Większe spadki plonu mogą wystąpić, jeżeli wirus infekuje rośliny porażone innymi patogenami. W badaniach własnych stwierdzono, że za pomocą literaturowych starterów do wykrywania PVM za pomocą testu RT-PCR, niektóre polskie izolaty polowe PVM nie są wykrywane. Dlatego podjęto prace nad opracowaniem nowych starterów do wykrywania tego wirusa w oparciu o konserwatywne regiony jego genomu.

MATERIAŁY I METODY

W celu zaprojektowania uniwersalnych starterów do wykrywania PVM, konserwatywne regiony genomu wirusa identyfikowano poprzez dopasowanie sekwencji dostępnych w banku genów za pomocą programu Genieous (Biomatters). Dla tych regionów zaprojektowano pary starterów, których skuteczność badano testem RT-PCR. Z liści roślin zainfekowanych PVM RNA izolowano wg Zacharzewska i in. (1). Uzyskane RNA doprowadzono do 100 ng/1µl i seryjnie rozcieńczono do 10 fg/1µl. Syntezę cDNA wykonano za pomocą Reverse Verte Kit z przypadkowymi heksamerami wg. zaleceń producenta (Novazym). Do reakcji łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) wykorzystano 2,5 µl cDNA. Mieszanina PCR poza cDNA w końcowej objętości 10 µl zawierała: 2 mM MgCl₂; trójfosforany nukleotydów (dATP, dCTP, dGTP i dUTP) w stężeniu 0,2 mM każdy; 0,5 N-glikozydazy urydynowej (Bioline); 0,4 µM startery, 1x bufor polimerazy i 1,25 U polimerazy GoTaq® Hot Start (Promega). Reakcję wykonywano wg następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja – 3 min w 95°C, 35 cykli złożonych z denaturacji przez 1 min w 94°C; przyłączaniu starterów w 55°C przez 1 min, wydłużaniu starterów w 72°C przez 1 min. Końcowe wydłużanie prowadzono przez 5 min w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano za pomocą elektroforezy w 1,5% agarozie (140V przez 40 min). Żele barwiono za pomocą barwnika GelGreen (Biotium) i produkt reakcji wizualizowano poprzez wzbudzenie fluorescencji kompleksu barwnika z DNA przy 470 nm za pomocą transiluminatora Blue Box (Invitrogen). Żele dokumentowano za pomocą aparatu Nikon D90 z zastosowaniem pomarańczowego filtra. Czułość badano dla opracowanych starterów. Do porównaniu wybrano startery opracowane przez Crosslin i Hamlin (2).

WYNIKI

Stwierdzono, że najbardziej konserwatywną częścią genomu jest 3'-końcowy region obejmujący gen białka płaszcza, białko 13K i 3'-końcowy region niekodujący. Dla tego regionu zaprojektowano dwie pary starterów – M1 i M2. Trzecią parę M3 zaprojektowano dla regionu leżącego w połowie genomu PVM (Tabela 1). Badane startery porównywano ze starterami CH opublikowanymi przez Croslin i Hamlin (2). Pary M1, M2 oraz CH promowały amplifikację produktu PCR o długości zgodnej z przewidywaną. Natomiast dla pary M3 nie obserwowano powstawania produktu reakcji PCR. Starter M3R jest zdegenerowany w 3 pozycji licząc od końca 3', co mogło negatywnie wpłynąć na efektywność amplifikacji przez parę M3. Dlatego wykluczono tę parę z dalszych prac. Czułość zaprojektowanych starterów M1 i M2 porównywano z czułością starterów CH (Rys. 2). Dla pary starterów CH produkt amplifikacji obserwowano do 10 pg/reakcję (Rys. 2A, ścieżka 5). Oba startery M1 i M2 promowały amplifikację produktu PCR do 1 pg RNA/reakcję (Rys. 2BC, ścieżki 6). Jednak wydajność amplifikacji uzyskana za pomocą pary M2 była większa (Rys. 2C, ścieżka 6). Żadna z badanych par starterów nie amplifikowała produktów niespecyficznych w obecności 100 ng RNA izolowanego ze zdrowych roślin (Rys. 2ABC, ścieżka 11). Również w reakcjach, do których nie dodano RNA na etapie odwrotnej transkrypcji (Rys. 2A-C, ścieżka 9) lub cDNA na etapie PCR (Rys. 2A-C, ścieżka 10) nie powstały produkty niespecyficzne. Świadczy to tym, że wszystkie badane startery są specyficzne i nie tworzą dimerów starterów. Na podstawie wykonanych badań, stwierdzono, że optymalną parą starterów do wykrywania PVM jest para M2



Rys. 1. Dopasowanie sekwencji genomowych RNA szczepów PVM. Pokrewieństwo filogenetyczne oznaczono na niebiesko. Podano numery akcesyjne sekwencji izolatów w banku genów Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI, USA). W nawiasach podano nazwy izolatów. Kolor czarny oznacza regiony o identycznej sekwencji nukleotydowej, kolor szary oznacza regiony o dużym podobieństwie sekwencji. Nad dopasowaniem sekwencji umieszczono wykres obrazujący kolorem zielonym regiony konserwatywne. Numery nad wykresem określają sekwencję genomu w liczbie nukleotydów.

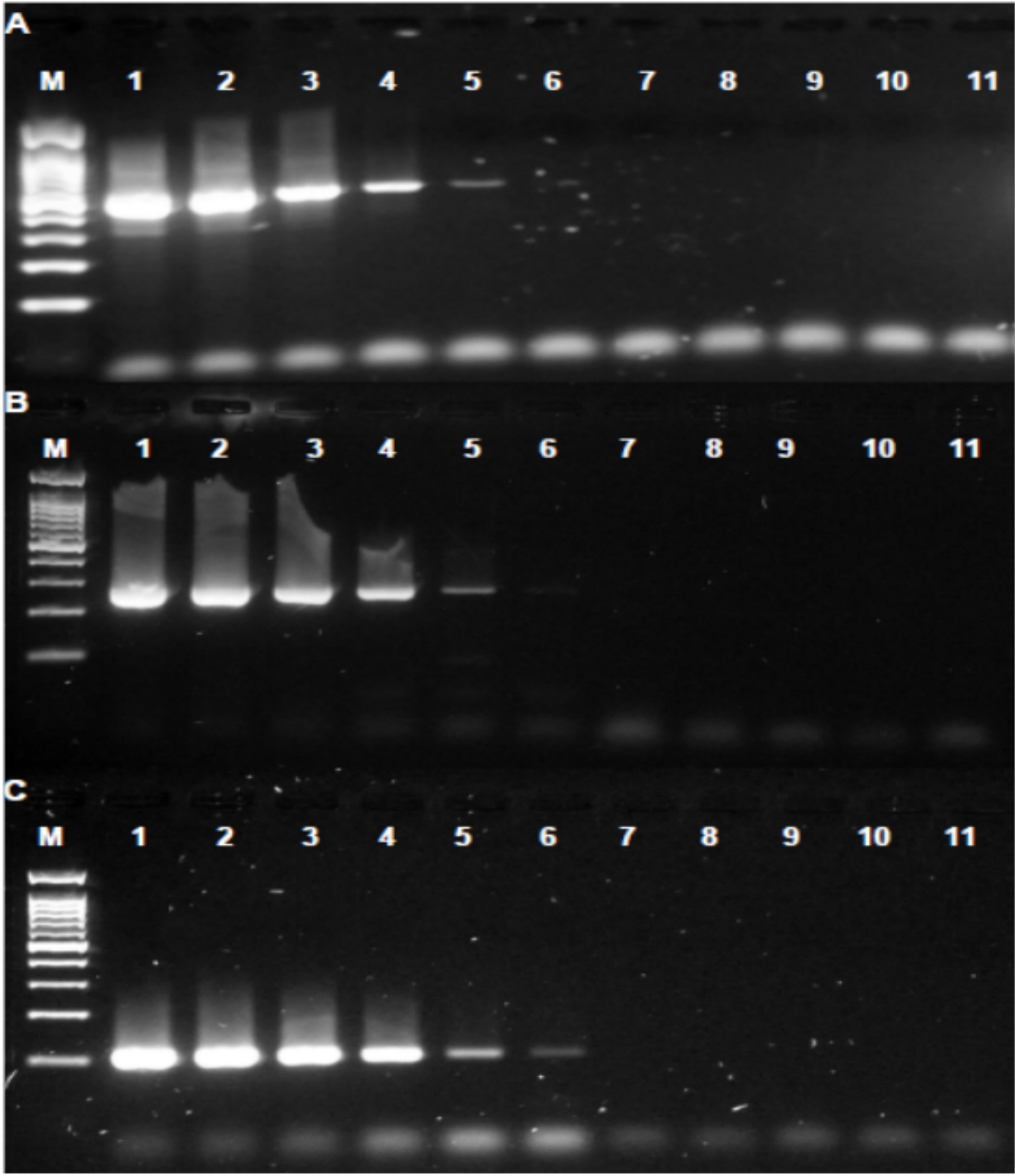
LITERATURA

- Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014. The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of potato virus Y. American Journal of Potato Research, 91: 525-531.
- Crosslin, J.M., and L.L. Hamlin. 2011. Standardized RT-PCR conditions for detection and identification of eleven viruses of potato and potato spindle tuber viroid. American Journal of Potato Research 88: 333–338.

Tabela 1. Sekwencje i pozycja w genomie PVM własnych par starterów M1-M3 oraz starterów CH, zaprojektowanych przez Crosslin i Hamlin (2011). Dla każdej pary podano wielkość spodziewanego produktu PCR w liczbie par zasad (pz).

Nazwa	Sekwencja (5'-3')	Pozycja*	Produkt (pz)
M1F	CTCCGTATTCTGGATCCGC	7701-7720	282
M1R	GGTCGCCTGATCAATCCCTC	7982-7963	
M2F	GAGGGATTGATCAGGCGACC	7963-7982	121
M2R	CAGTGACCTCGGCATTGAGA	8083-8064	
M3F	CCAAACAACGGGTGCGAAG	4746-4765	288
M3R	GCAGCACTTTTGCTCAGYTT	5034-5015	
CH-MF	GCCACATCYGAGGACATGAT	7585-7604	523
CH-MR	GTGAGCTCSGGACCATTCAT	8108-8089	

* - pozycję podano dla referencyjnego genomu PVM o numerze akcesyjnym NC_001361.2 w banku genów Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI, USA).



Rys. 2. Wpływ starterów: CH (A), M1 (B) i M2 (C) na czułość wykrywania PVM metodą RT-PCR. Ścieżki 1-8, 10-krotne seryjne rozcieńczenia od 100 ng do 10 fg RNA dodanego do odwrotnej transkrypcji (RT) w reakcji; ścieżka 9 – do reakcji RT dodana woda, a nie RNA (ślepa RT); ścieżka 10 - reakcja PCR uzupełniona wodą zamiast cDNA (ślepa PCR), ścieżka 11 - reakcja uzupełniona o RNA wyizolowane ze zdrowych roślin, poddane odwrotnej transkrypcji i amplifikowane przez PCR (kontrola negatywna). M - marker Nova 100 bp DNA (Novazym), między 100-1000 pz co 100 pz, powyżej 1000 pz – jeden prążek o wielkości 1500 pz.

WNIOSKI

- Pary starterów M1 i M2 wykrywały PVM z czułością większą o rząd wielkości od pary starterów literaturowych CH.
- Wydajność amplifikacji była najwyższa dla pary M2.
- Optymalną parą starterów do wykrywania PVM jest para M2