

WPLYW SPOSOBU IZOLACJI RNA NA CZUŁOŚĆ WYKRYWANIA WIRUSA Y ZIEMNIAKA ZA POMOCĄ RT- PCR



Bogumiła Zacharzewska, Agnieszka Przewodowska, Krzysztof Treder
IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie

WSTĘP

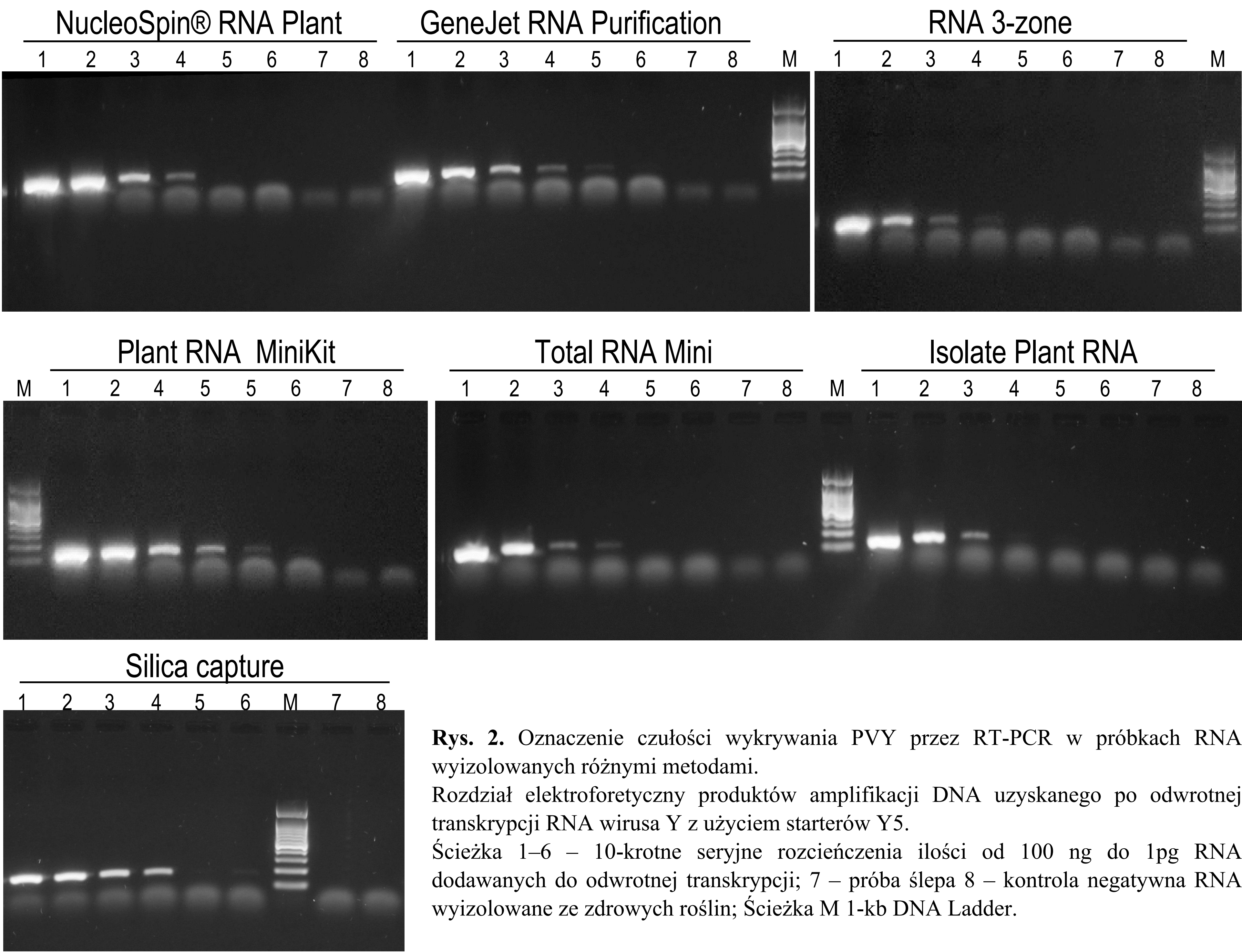
Czułość w wykrywaniu wirusów metodami molekularnymi głównie uzależniona jest od jakości i ilości wyizolowanego RNA. Istnieje wiele metod izolacji kwasów nukleinowych z roślin. Przygotowanie prób oraz koszt ekstrakcji RNA może być głównym problemem dla skutecznego dostosowania RT - PCR do rutynowego badania bulw. Celem doświadczenia było dostosowanie ręcznej metody izolacji RNA z tkanek ziemniaka przy użyciu krzemionki. Do badań wybrano wirusa Y ziemniaka (PVY) z powodu jego obecnie największego zagrożenia upraw ziemniaków.

MATERIAŁY I METODY

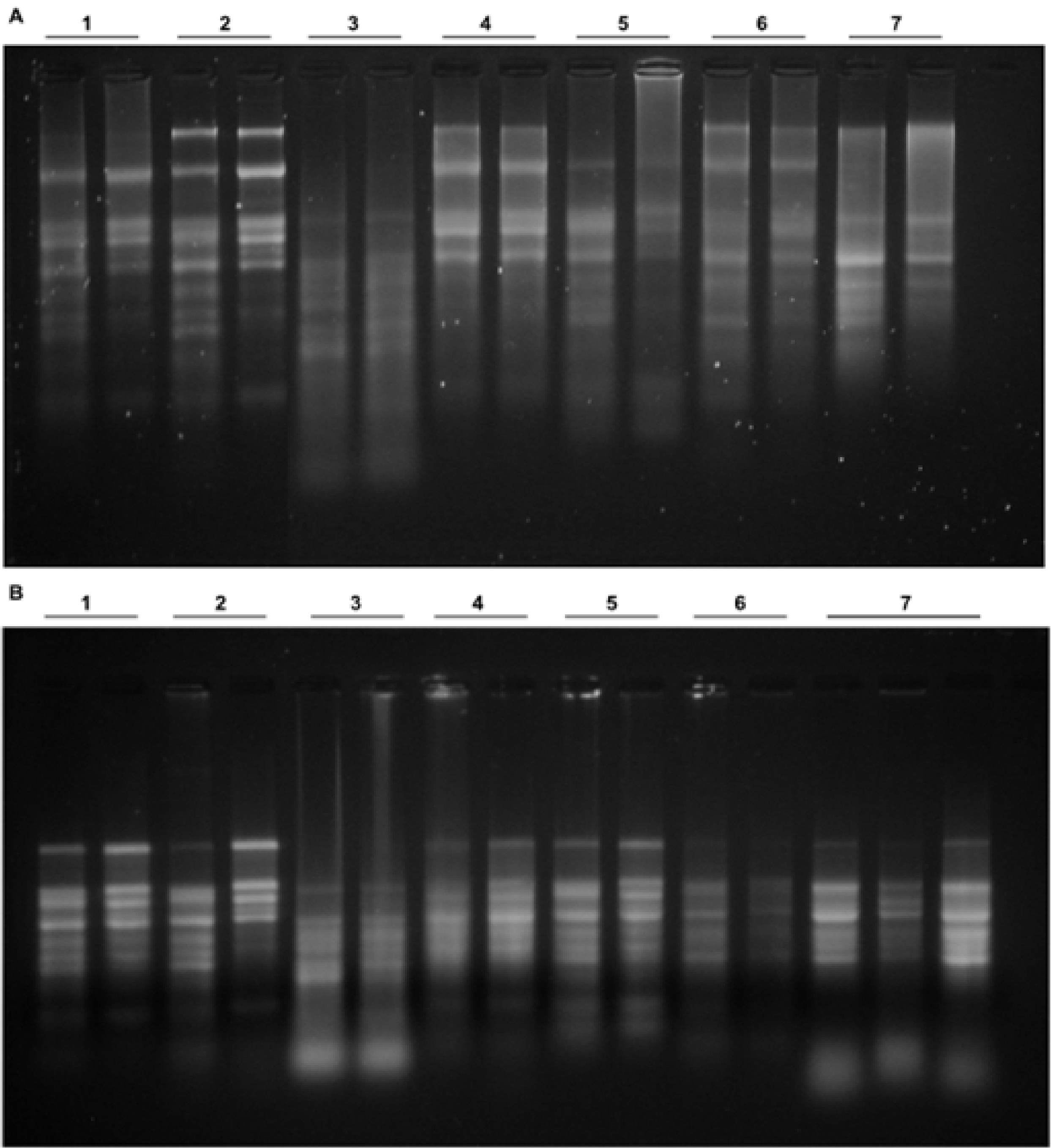
Materiałem badawczym były losowo zebrane liście roślin ziemniaka porażone wirusem PVY. Z próby zbiorczej odważano po 100 mg tkanki i używano jako źródło do izolacji RNA, zaś w metodzie izolacji na krzemionce wykorzystano sok z roślin (ok. 50 µl). Izolacja RNA przy użyciu komercyjnych zestawów była wykonana wg firmowych protokołów. Wszystkie izolacje były wykonane w dwóch powtórzeniach. Przetestowano następujące zestawy : NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel), Isolate Plant RNA (Bioline), Plant RNA MiniKit (Syngen), GeneJet RNA Purification (Thermo Scientific), Zestaw do izolacji całkowitego RNA z bakterii, hodowli komórkowych, tkanek i krwi (A & A Biotechnology), RNA 3-zone (Novazym). Zestawy oparte o kolumnienki były bardzo wygodne i pozwalały na szybkie oczyszczenie RNA. We wszystkich należało homogenizować tkankę w ciekłym azocie na jednolity proszek. Typowa objętość elucji RNA wynosiła 50 µl. Wśród wybranych zestawów najtańszy był odczynnik RNA 3-zone, zaś najdroższy (7 - krotnie wyższe koszty na próbę) – zestaw NucleoSpin RNA Plant (Tabela 1).

WYNIKI

Wszystkie testowane metody pozwoliły na izolację dobrej jakości, niezdegradowanego RNA. Jednak w większości preparatów widać wyraźne zanieczyszczenie genomowym DNA. Preparaty analizowano w żelu agarozowym przed (Rys. 1A) i po trawieniu deoksyrybonukleazą I (Rys. 1B). Najwygodniejsze były kity NucleoSpin RNA Plant oraz Plant RNA MiniKit. Izolacja w obu przypadkach została zrealizowana w ciągu 30 minut, ale dała tylko 15 ng RNA. Dłuższy czas izolacji (60 min) przy użyciu zestawu GeneJet RNA Purification został zrekomensowany przez bardzo łatwą procedurę i dobrą wydajność RNA (26 ug). Aby sprawdzić czy wybór metody izolacji RNA może wpływać na czułość wykrywania PVY za pomocą RT-PCR wszystkie RNA doprowadzono do 100 ng/ml i 10-krotne rozcieńczano do 1pg/ml. Dla uproszczenia kwasy nukleinowe wyizolowane przy użyciu krzemionki rozcieńczano tak samo, więc całkowita wartość RNA dla tej metody była niższa. Syntezę cDNA przeprowadzono przy użyciu zestawu do odwrotnej transkrypcji Super Verte Kit (Novazym). DNA amplifikowano w reakcji PCR przy użyciu starterów Y5-F oraz Y-5R generujących produkt wielkości 159 pz. Przy wyższych stężeniach RNA wszędzie był widoczny wyraźny prążek, jednak w najniższym stężeniu RNA (1pg/ml całkowitego RNA) słaby, ale specyficzny prążek wykryto tylko w próbkach RNA izolowanych przy użyciu krzemionki, zestawu GeneJet RNA Purification oraz zestawu Plant RNA MiniKit (Rys. 2).



Rys. 2. Oznaczenie czułości wykrywania PVY przez RT-PCR w próbkach RNA wyizolowanych różnymi metodami. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji DNA uzyskanego po odwrotnej transkrypcji RNA wirusa Y z użyciem starterów Y5. Ścieżka 1–6 – 10-krotne seryjne rozcieńczenia ilości od 100 ng do 1pg RNA dodawanych do odwrotnej transkrypcji; 7 – próba ślepa 8 – kontrola negatywna RNA wyizolowane ze zdrowych roślin; Ścieżka M 1-kb DNA Ladder.



Rys. 1. Wpływ metody izolacji na jakość RNA
Elektroforeza całkowitego RNA w 1,5% żelu agarozowym. Preparaty RNA poddano elektroforezie bezpośrednio po izolacji (A) i po trawieniu DNazą I (B).
1– Macherey-Nagel; 2 – Thermo Scientific; 3 – Novazym Polska; 4 – Syngen;
5 – A & A Biotechnology; 6 – Bioline, 7 – Krzemionka .
Powielone ścieżki odpowiadają dwóm niezależnym izolacjom wykonanym w ten sam sposób.

Tabela 1 Porównanie kosztów i wydajności różnych zestawów do izolacji RNA							
Zestaw	A	B	C	D	E	F	G
Koszt izolacji (zł)	17.6	11.8	2.5	6.7	8.4	15.5	4.6
Czas izolacji (min)	30	60	150-180	30	45	50	50
Wydajność [mg/ml]	0.31	0.52	0.67	0.30	0.49	0.26	0.61
Czystość (stosunek 260/280)	2.17	2.09	2.00	2.13	2.17	2.13	1.87

A – NucleoSpin RNA Plant, B – GeneJet RNA Purification, C – RNA 3-Zone, D – Plant RNA MiniKit, E – A&A, F – Isolate Plant RNA, G – silica

WNIOSKI

- Najwyższą czułość detekcji PVY osiągnięto stosując RNA wyizolowane na krzemionce oraz przy użyciu komercyjnych zestawów - Plant RNA MiniKit (Syngen) i GeneJet RNA Purification (Thermo Scientific).
- Izolacja RNA na krzemionce jest równie wiarygodna i opłacalna jak przy użyciu komercyjnych zestawów do izolacji RNA.
- Procedura z wykorzystaniem krzemionki idealnie nadaje się do rutynowej oceny stanu zdrowia roślin in vitro.