

Adaptacja izotermicznego testu RT-LAMP do oceny porażenia bulw wirusem Y ziemniaka

Joanna Choluj, Bogumiła Zacharzewska, Krzysztof Treder

Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie;
j.choluj@ihar.edu.pl

Celem przeprowadzonych w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii badań był dobór optymalnych starterów do szybkiego wykrywania wirusa *Y ziemniaka* (PVY) za pomocą RT-LAMP oraz adaptacja procedury izolowania RNA z badanych prób do warunków polowych.

PROJEKTOWANIE STARTERÓW I PORÓWNANIE CZUŁOŚCI UZYSKIWANEJ ZA ICH POMOCĄ.

Za pomocą programu LAMP Designer (Premier Biosoft) opracowano trzy zestawy starterów do wykrywania PVY (Y2, Y4, Y5). Startery te zostały porównane pomiędzy sobą oraz ze starterami opisanymi w literaturze (Almasi i in., 2012, Nie, 2005). W celu porównania czułości wykrywania PVY za ich pomocą, totalne RNA izolowane z roślin zainfekowanych PVY doprowadzono do 100 pg/1 µl i seryjnie rozcieńczono do 10 fg/1 µl. Po 1 µl takich rozcieńczeń dodano do mieszaniny reakcyjnej RT-LAMP (25 µl), która zawierała startery: 1,5 µmol FIP i BIP (wewnętrzne); 0,75 µmol LF i LB (zapętlające); 0,375 µmol F3 i B3 (zewnętrzne) oraz 15 µl Isothermal Mastermix Fluorescent Dye (IS0-13001, Novazym) i 10 U odwrotnej transkryptazy (OptiGene). Amplifikacja była prowadzona w 65°C przez 30 min. Specyficzność uzyskanych produktów analizowano przez wyznaczenie temperatury przyłączania nici powstałego produktu w gradiencie temperatury 95°C-80°C (0,05°C/s). Oba etapy, jak również monitorowanie fluorescencji w czasie rzeczywistym przeprowadzono za pomocą urządzenia Genie II (OptiGene). Odczyty fluoroscencyjne eksportowano do programu Excel (MS Office), a krzywe amplifikacji wykreślono stosując oprogramowanie GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Kontrolami były próby RNA izolowane ze zdrowych roślin oraz reakcje ślepe, do których zamiast RNA dodano wodę. Dla zestawu Y4 testowano wpływ stężenia i wzajemnych proporcji każdej z trzech par starterów na skuteczność reakcji.

OPTIMALIZACJA IZOLACJI RNA

W celu izolacji RNA opracowano metodę polegającą na wykorzystaniu

mikrosfer magnetycznych. Procedurę izolacji RNA na krzemionce (Zacharzewska i inni 2014) zmodyfikowano pod kątem szybkości izolacji i adaptacji do wykonania w warunkach polowych. W tym celu krzemionkę zastąpiono mikrosferami magnetycznymi. Wykorzystano bufor L6 i L2 wytworzone w sposób opisany przez Boom i inni (1990). Izolację wykonano według Malinowskiego (1997). Sok z liści (0,1 ml) dodano do próbek zawierających 0,05 ml zawiesiny kulek magnetycznych w 0,9 ml buforu L6. Probówki delikatnie wytrząsano, inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, i umieszczono na statywie magnetycznym. Supernatant odrzucono, a osad przemywano dwukrotnie przy użyciu 1 ml buforu L2, dwukrotnie 1 ml 70% etanolu i raz 1 ml acetonu. Etapy przemywania składały się z mieszania poprzez odwrócenie próbek, a następnie umieszczenie w statywie magnetycznym. Osad suszono 10 minut w temperaturze 56°C w termobloku. Mikrosfery magnetyczne zawieszano w 0,05 ml sterylnej wodzie, delikatnie wytrząsano i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 56°C. Kulki magnetyczne osadzono przy pomocy statywu magnetycznego, a supernatant zebrano. W celu adaptacji RT-LAMP do warunków polowych konieczne było opracowanie metody szybkiej izolacji RNA, dlatego podjęto próbę skrócenia izolacji. Zastosowano cztery warianty w których pominięto etap przemywania acetonem, suszenia osadu oraz skrócono czas inkubacji RNA w 56°C do 5 min. (Tab. 1).

Charakterystyka wariantów przemywania

Tabela 1

Parametry	Wariant 1	Wariant 2	Wariant 3	Wariant 4
Objętość soku [ml]	0,2	0,2	0,1	0,1
Liczba płukań	2 × L2	1 × L2	2 × L2	1 × L2
	2 × etanol	1 × etanol	2 × etanol	1 × etanol

WYNIKI I DYSKUSJA

W ramach zadania zaprojektowano trzy zestawy starterów (Y2, Y4 i Y5), porównano skuteczność i czułość wykrywania PVY za ich pomocą oraz za pomocą starterów znanych z literatury (Almasi i in. 2013, Nie 2005). Spośród badanych starterów najwyższą czułość detekcji uzyskano stosując startery Y4. Dla tych starterów optymalizowano sposób izolacji RNA tak, aby izolacja możliwa była do wykonania w warunkach polowych, bez konieczności używania wirówki. W tym celu zastosowano statyw magnetyczny oraz opracowano uproszczoną metodę izolacji RNA na mikrosferach magnetycznych. Wykazano, że zastosowany układ buforowy oraz skrócona do kilku minut procedura izolacji RNA pozwala na skuteczne wykrycie PVY w próbach zawierających 10 pg całkowitego RNA. Stosując nieznacznie dłuższe procedury

zastosowane w wariantach 1 i 3 wykryto PVY w 1 pg całkowitego RNA.

LITERATURA:

- Almasi M.A., Dehabadi S.H. 2013. Colorimetric Immunocapture Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of the *Potato virus Y*. J Plant Pathol Microb 4: 188 doi:10.4172/2157-7471.1000188
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M, Jansen C.L., Wertheim-Van Dillen P.M.E. and Van Der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28:495-503.
- Malinowski, T. 1997. Silica capture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): application for the detection of several plant viruses. Diagnosis and Identification of Plant Pathogens 11: 445-448.
- Nie X. 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of *Potato virus Y*. Plant Dis. 89:605-610.
- 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.