

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



Joanna Chołuj, Bogumiła Zacharzewska, Krzysztof Treder

IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie

k.treder@ihar.edu.pl

WSTĘP

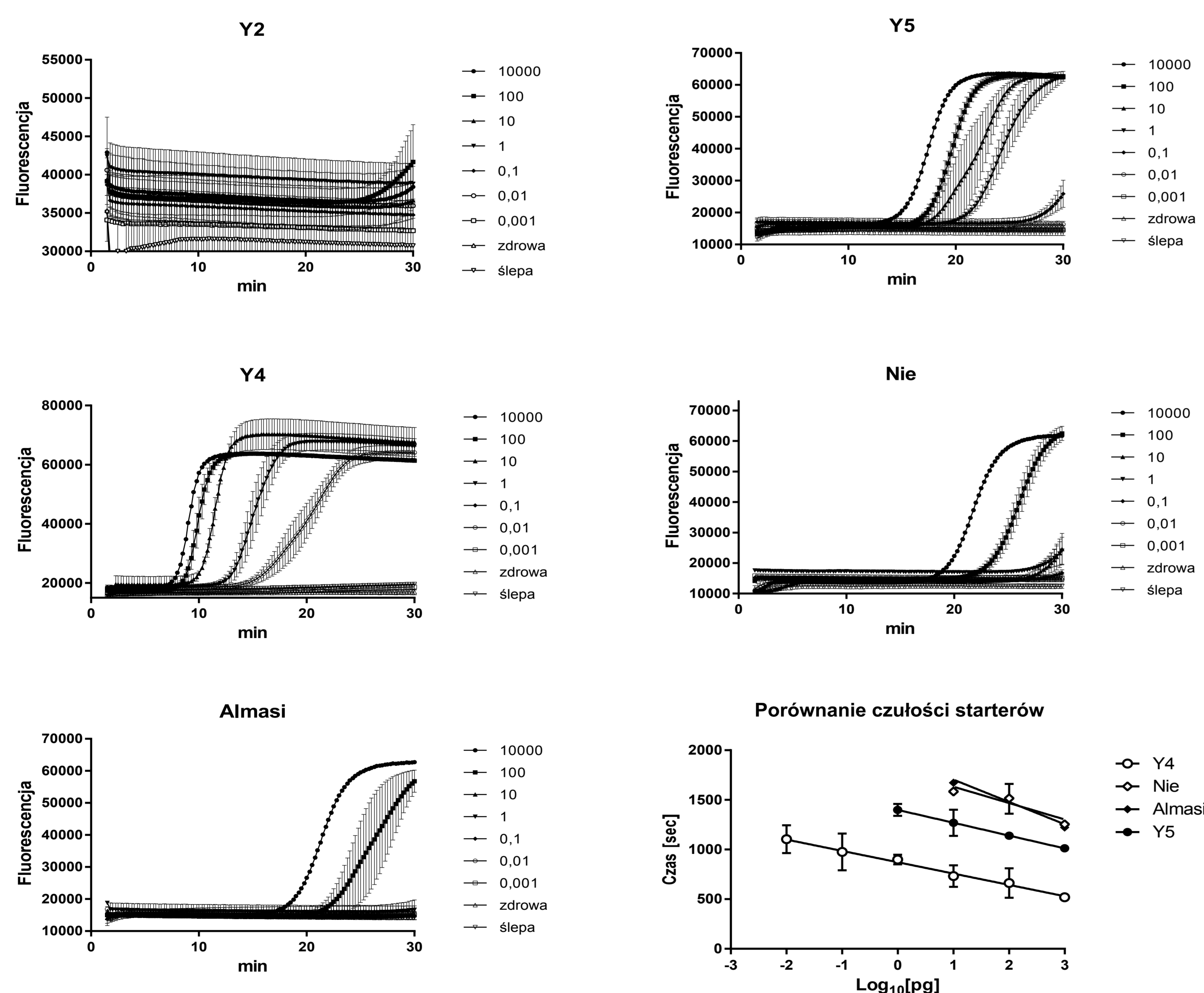
Celem przeprowadzonych w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii badań był dobór optymalnych starterów do szybkiego wykrywania wirusa Y ziemniaka (PVY) za pomocą RT-LAMP oraz adaptacji procedury izolowania RNA z badanych prób do warunków polowych.

MATERIAŁY I METODY

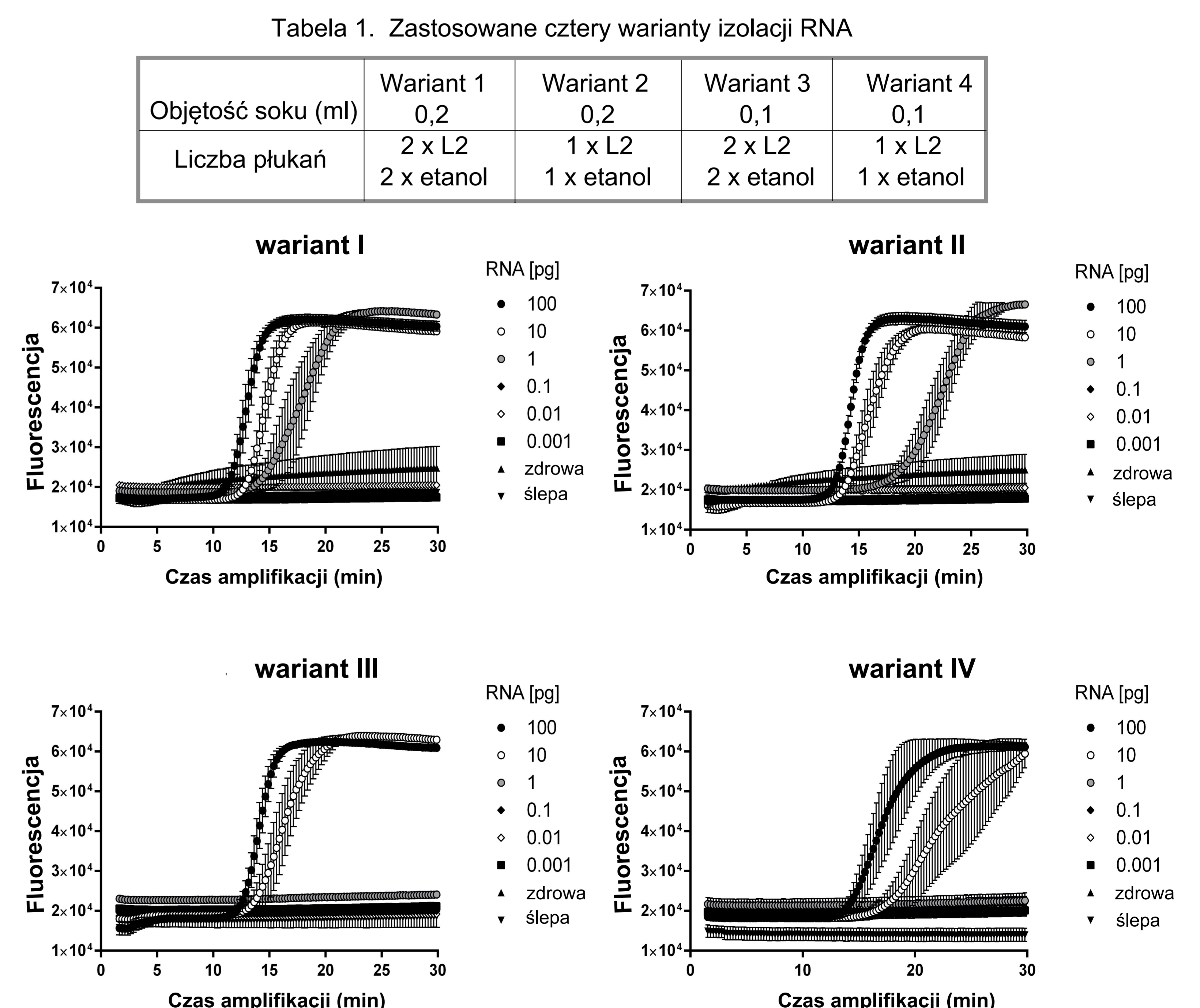
Projektowanie starterów i porównanie czułości uzyskiwanej za ich pomocą. Za pomocą programu LAMP Designer (Premier Biosoft) opracowano trzy zestawy starterów do wykrywania PVY (Y2, Y4, Y5). Startery te zostały porównane pomiędzy sobą oraz ze starterami opisanymi w literaturze (Almasi i in., 2012, Nie, 2005). W celu porównania czułości wykrywania PVY za ich pomocą, totalne RNA izolowane z roślin zainfekowanych PVY doprowadzono do 100 pg/1µl i seryjnie rozcieńczono do 10 fg/1µl. 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 15µl Isothermal Mastermix Fluorescent Dye (ISO-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.

Optymalizacja 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 odrzucano, 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 probówek, 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).

WYNIKI



Rysunek 1. Porównanie czułości opracowanych starterów do testu LAMP ze starterami literaturowymi. Opracowane startery : Y2, Y4 i Y5. Startery literaturowe: Almasi i Nie. Czułość detekcji za pomocą różnych zestawów starterów wyrażona jako zależność czasu potrzebnego (w sekundach) do uzyskania pozytywnego wyniku od logarytmu stężenia całkowitego RNA. Zdrowe rośliny – zdrowa, kontrole negatywne z wodą zamiast RNA – ślepa.



Rysunek 2. Skuteczność wykrywania PVY za pomocą układu buforów z solą chaotropową na mikrosferach magnetycznych. Zdrowa – RNA izolowane ze zdrowych roślin, ślepa – do reakcji dodawano wodę zamiast RNA.

WNIOSKI

- Opracowano bardzo czuły zestaw starterów (Y4) do reakcji RT-LAMP, pozwalający na wykrycie PVY w ciągu 10-20 minut.
- Opracowano szybki sposób izolacji RNA, możliwy w warunkach polowych.
- Całkowity czas wykonania testu w oparciu o powyższe modyfikacje wynosi mniej niż 40 minut.