

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КАРТОФЕЛЯ*

Г.Н. АНДРЕЕВА, Е.А. ЧАКИНА, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии)

Предложена доступная и эффективная методика экстракции РНК из микроклубней картофеля. Оптимизированный протокол позволяет получать качественный препарат РНК, пригодный для проведения ПЦР, экономичен во времени и материальных затратах, исключает использование вредных реагентов (Р-меркаптоэтанол, фенол и др.), не требует дорогостоящих реактивов и оборудования.

Ключевые слова: вирусные болезни картофеля, полимеразная цепная реакция (ПЦР), рибонуклеиновая кислота (РНК)

Вирусы растений и их переносчики вследствие негативного влияния на продуктивность, качество и срок хранения получаемой растениеводческой продукции являются причиной серьезных экономических потерь в сельском хозяйстве. В отличие от других растительных патогенов вирусы вызывают заболевания, протекающие бессимптомно, либо неотличимые по внешним проявлениям от невирусных патологий (грибные, бактериальные болезни) или реакций растения на различные стрессовые факторы окружающей среды. Кроме того, вирусные инфекции, как правило, не поддаются лечению и накапливаются в последующих поколениях, что особенно важно для культур, посадочный материал которых получают путем вегетативного размножения [1].

Вырождение сортов — одна из главных проблем в семеноводстве картофеля. В результате того, что при ре-

продуцировании в растениях постепенно накапливаются вирусные, виroidные, грибные, бактериальные и микоплазменные патогены, с течением времени сорт теряет первоначальную продуктивность и другие хозяйственно ценные признаки.

В настоящее время известно около 25 видов вирусов и виroidов, инфицирующих культуру картофеля. Однако наиболее опасными считаются заболевания, вызываемые вирусами X (PVX), Y (PVY), скручивания листа (PLRV) и виroidом веретеновидности клубней (PSTVd). В зависимости от сорта и условий выращивания вызываемые этими инфекциями потери урожая составляют от 30 до 90%, а ухудшение качества продукции связано с измельчением клубней, изменением биохимического состава и, как следствие, вкусовых и потребительских качеств мякоти.

Для определения вирусной инфекции широко применяют методы им-

* Работа выполнена в рамках государственного контракта № ГК-769-1/А с Министерством сельского хозяйства РФ, а также с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования.

Авторы выражают благодарность за помощь, оказанную в процессе проведения исследований и написания работы, сотрудникам Центра молекулярной биотехнологии: к.б.н. М.Ю. Куклеву, к.б.н. М.Г. Дивашуку, к.б.н. И.А. Фесенко.

муноферментного анализа (ИФА), а также ELISA-тест с использованием специфических моноклональных антител. Данные методы просты и удобны при проведении рутинных анализов, однако обладают рядом недостатков. Во-первых, все иммунологические методы имеют низкий предел чувствительности, что ограничивает их использование для анализа образцов с незначительной вирусной нагрузкой. Во-вторых, антисыворотки могут давать неспецифические перекрестные реакции, что приводит к ложноположительным результатам. В-третьих, большинство методов, основанных на выявлении антител, дают результат либо только в разгар болезни, либо на 7-14-й день после заражения, а зачастую еще позже [11].

На сегодняшний день для детекции вирусной патологии широко применяются молекулярные методы исследования: RT-PCR (обратная транскрипция с последующим проведением полимеразной цепной реакции), real-time PCR (ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени), multiplex PCR (ПЦР, позволяющая детектировать несколько видов вирусов в одной пробирке) [10]. Использование ПЦР существенно повышает надежность контроля, способствует быстрой диагностике в экстренных ситуациях, что особенно важно для своевременного выявления патологии исходного посадочного материала, полученного путем микрклонального размножения [2, 7, 8].

Однако применение молекулярных методов для детекции вирусных заболеваний связано с рядом сложностей, основной из которых является выделение из растительных тканей качественной РНК. Литературные данные представлены многочисленными протоколами экстракции нуклеиновых кислот с использованием различных буферных систем. Необходимо отметить, что большинство протоколов, связан-

ных с выделением РНК, довольно трудоемки, длительны, зачастую дороги, и включают вредные и опасные для здоровья человека компоненты, такие как фенол, (3-меркаптоэтанол, а также другие канцерогенные реагенты, имеющие неприятный и стойкий запах, что требует определенных условий для работы с ними [4, 9, 13].

Целью настоящей работы было создание упрощенного протокола выделения РНК из микроклубней картофеля, пригодного для детекции вирусных инфекций методом RT-PCR.

Материалы и методы

Объектами исследования служили пробирочные растения и микроклубни картофеля, полученные путем микрклонального размножения.

Все используемые растворы, а также стеклянная посуда были приготовлены на воде, обработанной 0,1%-м диэтилпирикарбонатом (КЕРС).

Для выделения РНК использовали экстракционный буфер: 2% (w/v) СТАВ; 2% PVP (M=25000); 100 mM Tris-HCl (pH=8,0); 25 mM ЕКТА; 2M NaCl; 0,05% spermidine trihydrochloride; 10 mM dithiothreitol и буфер для растворения и хранения РНК (ТЕ): ЮОтМ Tris-HCl; ЮтМ ЕКТА

Протокол выделения РНК

1. Нагревали экстракционный буфер до 65°C на водяной бане. В эппендорфы помещали образцы измельченных микроклубней (0,05 - 0,1 г) и заливали 600 мкл нагретого экстракционного буфера. Тщательно растирали образцы пестиками. Инкубировали 15 мин при 65 °C на водяной бане. Во время инкубации образцы несколько раз перемешивали путем перворачивания пробирок.

2. Добавляли равный объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и встряхивали на вортексе. Центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 мин.

3. Переносили супернатант в новую пробирку, повторно экстрагировали образец аликвотой смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), центрифугировали при тех же условиях.

4. Супернатант осторожно перенесли в новую пробирку. Для того чтобы выделенная РНК была высокого качества, необходимо избегать попадания смеси хлороформ-изоамилового спирта и интерфазы в новую пробирку. При возникновении подобной проблемы образцы могут быть снова процентрифугированы как описано выше.

5. Добавляли 0,25 объема ЮМ LiCl к супернатанту, перемешивали путем переворачивания в течение 5 мин.

6. Образцы инкубировали в течение ночи при 4°C.

7. Образцы центрифугировали при 14000 об/мин при 4°C в течение 35 мин. Осторожно сливали надосадочную жидкость.

8. Осадок промывали 75%-м этанолом путем центрифугирования при 14000 об/мин при 4°C в течение 10 мин.

9. Аккуратно сливали супернатант и осадок высушивали при комнатной температуре в течение 10 мин.

10. Осадок РНК ресуспендировали в 20–30 мкл обработанной КЕРС воды или ТЕ-буфера.

Спектрофотометрическое определение количества и качества РНК

Концентрацию нуклеиновой кислоты определяли с помощью спектрофотометра (Eppendorf Biophotometer 6131) при длине волны 260 нм (максимальное поглощение) в сравнении со стандартным раствором. Качество РНК определяли по содержанию белковых примесей (по величине отношения A 260/280) и примесей фенолов, полисахаридов и прочих вторичных метаболитов (по величине отношения A 260/230).

RT—PCR анализ

Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (Терцик-МЦ2,

ДНК-технология, Москва) при следующих условиях: реакционную смесь (РНК-матрица, гексапраймеры, вода, свободная от РНКаз) инкубировали 5 мин при 70°C, затем в охлажденные пробирки добавляли буфер, смесь dNTP и обратную транскриптазу (M-MLV). Смесь инкубировали в течение 10 мин при 25°C, затем 60 мин при 37°C. Реакцию останавливали нагреванием в течение 10 мин при 70°C. Полученную кДНК немедленно использовали для проведения PCR либо хранили при -20°C.

ПЦР проводили в амплификаторе при следующих условиях: реакционную смесь (кДНК, реакционный буфер, смесь dNTP, праймеры внутреннего контроля и специфичные праймеры, TaqДНК-полимераза) инкубировали в течение 2 мин при 94°C для начальной денатурации, затем проводили 35 циклов, включающих этапы: 1) 94°C — 45 с; 2) 55°C — 45 с; 3) 72°C — 45 с; завершающую элонгацию проводили при 72°C в течение 2 мин.

Электрофоретический анализ продуктов PCR

Продукты ПЦР разделяли в электрофорезной камере (Pharmacia EPS 500/400) в 1,2%-м агарозном геле, приготовленном на TBE буфере с добавлением бромистого этидия (0,5 мкг/мл), при напряжении электрического поля 6 В/см (источник питания (Pharmacia GNA-200)). Для определения размеров полученных фрагментов ДНК использовали маркер размеров (GeneRuler 100bp KNA Ladder, Fermentas). Полученные гели просматривали на трансиллюминаторе (Vilber Lourmat TCP-20.LM) под ультрафиолетом с длиной волны 254 нм.

Результаты и их обсуждение

Молекулярные методы исследования требуют высокого качества РНК, выделяемой из растительных образцов. Однако присутствие танинов, поли-

сахаридов, полифенолов и других вторичных продуктов метаболизма в растительных экстрактах ингибируют процессы RT-PCR [3].

Согласно литературным данным [12, 15] экстракция РНК из растительного материала сопряжена с рядом проблем. Во-первых, РНК, являясь лабильной структурой, быстро гидролизует активным и устойчивым ферментом рибонуклеазой, присутствующей во всех биологических субстанциях. Во-вторых, растения в процессе жизнедеятельности накапливают значительные количества полифенольных и полисахаридных компонентов, а также других вторичных метаболитов, которые при выделении рибонуклеиновой кислоты преципитируют с ней и в дальнейшем ингибируют ферментативные процессы RT-PCR. Кроме того, необходимо отметить, что каждая культура, а также различные ткани одного растения требуют специфического подхода для успешного выделения РНК.

Анализ методик экстракции РНК из тканей разных видов растений позволил нам выделить несколько источников [5, 6, 14], которые были взяты за основу модифицированного протокола. Состав экстрагирующего буфера включал СТАВ, который является основой многих протоколов. Выполняя функцию сильного детергента, он способствует разрушению ДНК-белковых комплексов. Роль антиоксиданта в используемом буфере отводилась РVP, который предотвращает ингибирование обратной транскрипции и ПЦР полифенолами и полисахаридами.

В данной работе мы провели спектрофотометрическое исследование полученных растворов РНК для определения количества и качества выделенной нуклеиновой кислоты. Количество РНК устанавливали величиной поглощения при длине волны 260 нм. За-

грязнения образцов распознавали исходя из соотношений показателей поглощения при различных длинах волн. Полученные нами по модифицированной методике растворы РНК имели следующие показатели (приведены средние значения для выборки, состоящей из 10 образцов, и стандартное отклонение): выход РНК (мкг/г образца) $45,9 \pm 4,2$; отношение $A_{260}/280$ $1,70 \pm 0,11$; отношение $A_{260}/230$ $1,68 \pm 0,13$.

Количество РНК в полученных экстрактах является достаточным для проведения ПЦР. Значение показателя $A_{260}/280$ (оптимальное значение для чистых растворов РНК должно приближаться к 2,0) свидетельствует о достаточной очистке образца от белковых загрязнений. Отношение $A_{260}/230$ меньше 2 (оптимальное значение для чистых растворов РНК должно быть больше 2), что говорит о контаминации низкомолекулярными компонентами (полисахариды, полифенолы), однако, как показали дальнейшие исследования, это не влияло на результаты полимеразной цепной реакции.

Таким образом, РНК, полученная нами по модифицированной методике, была достаточно высокого качества, что позволило использовать ее для детекции вирусных (PVY, PVX, PLRV) и виroidных (PSTVd) фитопатогенов картофеля методом ПЦР.

Кроме того, включение в реакцию амплификации дополнительных праймеров внутреннего контроля NAK5, специфичных консервативному митохондриальному гену фермента NAKH⁺-дегидрогеназы, позволило одновременно с детекцией патогена отслеживать наличие РНК в образце и качество прохождения обратной транскрипции и ПЦР (рис. 1-4).

Результаты анализа микроклубней картофеля на наличие инфекции методом ПЦР представлены на рисунках 1-4.

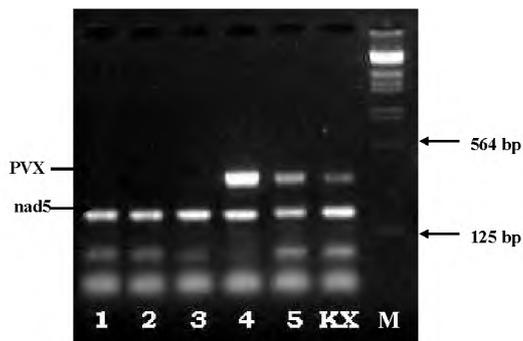


Рис. 1. Электрофоретический спектр продуктов ПЦР кДНК картофеля с праймерами nad5 (амплифицируемый фрагмент — 188 бп) и праймерами, специфичными вирусу X картофеля (амплифицируемый фрагмент — 359 бп); 1-5 — исследуемые образцы; KX — контрольный образец, зараженный вирусом X; M — маркер размеров.

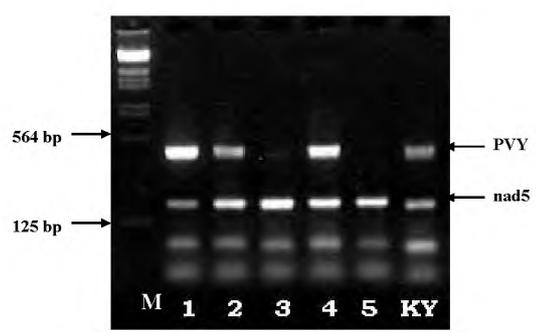


Рис. 2. Электрофоретический спектр продуктов ПЦР кДНК картофеля с праймерами nad5 (амплифицируемый фрагмент — 188 бп) и праймерами, специфичными вирусу Y картофеля (амплифицируемый фрагмент — 480 бп); 1-5 — исследуемые образцы; KY — контрольный образец, зараженный вирусом Y; M — маркер размеров.

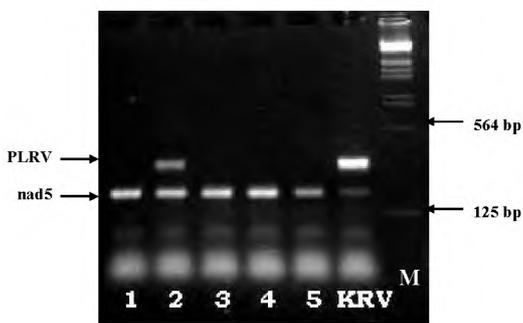


Рис. 3. Электрофоретический спектр продуктов ПЦР кДНК картофеля с праймерами nad5 (амплифицируемый фрагмент — 188 бп) и праймерами, специфичными вирусу скручивания листа картофеля (амплифицируемый фрагмент — 336 бп); 1-5 — исследуемые образцы; KRV — контрольный образец, зараженный вирусом PLRV; M — маркер размеров.

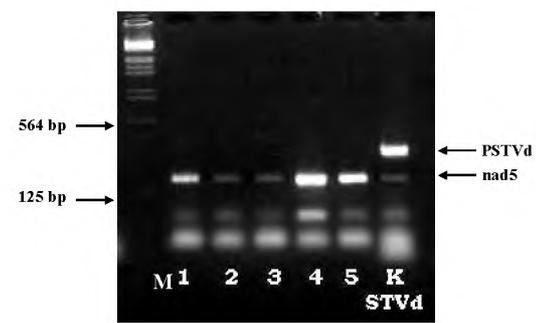


Рис. 4. Электрофоретический спектр продуктов ПЦР кДНК картофеля с праймерами nad5 (амплифицируемый фрагмент — 188 бп) и праймерами, специфичными вириоду веретеновидности клубней картофеля (амплифицируемый фрагмент — 362 бп); 1-5 — исследуемые образцы; KSTVd — контрольный образец, зараженный вириодом PSTVd; M — маркер размеров.

Заключение

При наличии большого количества разнообразных вирусов, поражающих культуру картофеля, проблема защиты растений картофеля является экономической значимой. Использование молекулярных методов может существенно повысить надежность контроля за вирусной инфекцией, своевременно не только установить наличие вирусной

инфекции, а также определить ее видовую принадлежность.

Модифицированная нами методика экстракции обеспечивает достаточный выход РНК из исследуемого материала, обеспечивает высокую чувствительность и специфичность ПЦР, не требует значительных трудовых и материальных затрат, исключает использование вредных реагентов.

Получение РНК высокого качества позволило успешно выявить и идентифицировать вирусы (PVY, PVX, PLRV) и вириод (PSTVd) в исследуемых образцах пробирочных растений и микроклубней картофеля с использованием RT-PCR, а также обеспечить повторяемость и воспроизводимость результатов анализа.

Библиографический список

1. *Нагорская В.П.* Ультраструктурные аспекты вирусного патогенеза и индуцированной 1,3;1,6-бета-К-глюканом устойчивости растений: Автореф. канд. дис. РАН. Дальневост. отд-ние. Тихоокеан. ин-т биоорган, химии. Владивосток, 2000.
2. *Barker H., Webater K.K. and Reavy B.* Ketection of potato virus Y in potato tubers: a compare of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Potato Research*, 1993. V. 36(1). P. 13-20.
3. *Ke Boer. S.H., Ward L.J, Li X. and Chittaranjan S.* Attenuation of PCR inhibition in the of plant compounds by addition of BLkTTk. *Nucleic Acids*, 1995. V. 23. P. 2567-2568.
4. *Malnoy M., Reinoird J.P., Mourgues F., Chevreau E., Simoneau P.* A Method for isolating total RNA from pear leaves. *Plant Mol. Biol. Rep*, 2001. V. 19. P. 69a~69f.
5. *Meisel L, Fonseca B., Gonzales S.* A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biol. Res.*, 2005. V. 38(1). P. 83-88.
6. *Pearson G., Lago-Leston A, Valente M.* Simple and rapid RNA extraction from freeze-dried tissue of brown algae and seagrasses *Eur. J Phycol*, 2006. V. 41. P. 97-104.
7. *Singh M., Singh R.* Factor affecting of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and spot hybridization. *J. Virol. Methods*, 1996. V. 60. P. 47-57.
8. *Singh R.P., Singh M.* Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Kis.*, 1998. V. 82. P. 230-234
9. *Valderrama-Chairez M.L., Cruz-Hernandez A. and Paredes-Lopez к.* Isolation of functional RNA from Cactus fruit. *Plant MoL Biol. Rep.*, 2002. V. 20. P. 279-286.
10. *Wang Z.K., Xia YX., Yuan Q., Tan W.Z.* Ketection of mix-infection potato viruses with multiplex RT-PCR. *Acta Phytopatology Sirica*, 2005. V. 35(2). P. 109-115.
11. *Weidemann, H.L. and Maiss E.* Ketection of the potato tuber ringspot strain of potato virus Y (PVY NTN) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *J. Plant Kis. Prot.*, 1996. V. 103. P. 337-345.
12. *Wilkins T.A. and Swart L.B.* Isolation RNA from plant tissue. In *A laboratory guide to RNA: Isolation, analyses and synthesis*, 1996. Wiley-Less. New-York. P. 21-41.
13. *Yuji Suzuki, Amane Makino, Tadahiko Mae.* An efficient method for extraction of RNA from rice leaves at different ages using benzyl chloride. *J. of Experimental Botany*, 2001. V. 52. № 360. P. 1575-1579.
14. *Ying Zeng, Too Yang.* RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002. V. 20. P. 417a~417e.
15. *Zhiwili, Trick H.N.* Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. *Biotechniques*, 2005. V. 38. P. 872-876.

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

SUMMARY

Accessible and effective method of RNA extraction from potato microtubers has been offered. Kptimized protocol allows to obtain RNA preparation of high quality fit for PCR, economical in terms of time and material cost, eliminates use of noxious reagents (b-mercaptoethonol, phenol e.t.c), doesn't require expensive reagents or equipment.

Key words: virus diseases of potato, polymerase chain reaction (PCR), ribonucleic acid (RNA).