

УДК 577.215.3

DOI 10.30679/2587-9847-2022-35-18-22

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ВИРУСОВ ИЗ РАСТЕНИЙ ВИНОГРАДА

Котляр В.К., аспирант, **Федорович С.В.**, аспирант, **Кожевников Е.А.**,
Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)

Реферат. Качество и целостность РНК имеют решающее значение для многих исследований в области молекулярной биологии растений. Для выделения РНК вирусов были отобраны молодые корни и листья саженцев винограда. В ходе выделения тотальной РНК из растительного материала винограда были использованы две различные методики, одна из которых базируется на применении буферов на основе реактива СТАВ, другая – протеиназы К и детергента SDS. Обе методики включали использование в качестве антиоксиданта β-меркаптоэтанол в различных концентрациях. Модификация метода с использованием протеиназы К заключалась в уменьшении финальной концентрации β-меркаптоэтанола до 1%. Сравнение качественных и количественных показателей препаратов РНК, полученных различными методами, показали, что модифицированный нами метод обеспечивает больший выход качественной РНК по сравнению с контрольным методом. Кроме того, модифицированный нами метод является менее токсичным по сравнению с контрольным.

Ключевые слова: экстракция РНК, ПЦР в реальном времени, черенки винограда, вирусы винограда

Summary. The quality and integrity of RNA is crucial for many studies in the field of plant molecular biology. Young roots and leaves of grape seedlings were selected to isolate RNA viruses. Two different techniques were used during the isolation of total RNA from the plant material of grapes. One of methods is based on the application of buffers grounded on the reagent STAB, the other – proteinase K and detergent SDS. Both methods included the use of β-mercaptoethanol in various concentrations as an antioxidant. Modification of the method using proteinase K was to reduce the final concentration of β-mercaptoethanol to 1%. A comparison of qualitative and quantitative indicators of RNA preparations obtained by various methods showed that the modified method provides a higher yield of high-quality RNA compared to the control method. In addition, our modified method is less toxic compared to the control method.

Key words: RNA extraction, real-time PCR, grape cuttings, grape viruses

Введение. Общее санитарное состояние виноградной лозы, выращиваемой на территории Краснодарского края в производственных масштабах, является важным показателем для прогнозирования будущих урожаев. Наличие ряда вирусных заболеваний значительно влияет на уровень урожайности виноградников уже через четыре или пять лет после закладки виноградных насаждений. Ущерб, нанесенный вирусами, колеблется в диапазоне 10-80% потерь урожая, в зависимости от типа вируса и степени его распространения [1].

Классическая диагностика вирусов, поражающих виноградную лозу, основана на методе растений-индикаторов, а также на иммуноферментном анализе (ИФА) [2]. Однако, растения-индикаторы – это дорогостоящий метод с проблемами для крупномасштабного анализа, который требует длительного времени для подтверждения инфекции по визуальным симптомам. Серологический анализ нивелирует эти недостатки, однако, основным ограничением данного метода является относительно высокий порог чувствительности обнаружения вирусных частиц, содержащихся в инфицированном материале в очень низких концентрациях. Это приводит к ложноотрицательному результату.

В настоящее время одним из самых информативных и высокоспецифичных методов идентификации вирусных инфекций является метод RealTime PCR (ПЦР в реальном времени, Реал-тайм ПЦР, РВ-ПЦР), позволяющий идентифицировать наличие патогена даже в небольшой концентрации, что очень важно на ранних стадиях заражения [3].

Качество выделенной РНК имеет решающее значение для проведения RealTime PCR.

Высококачественная экстракция РНК из виноградной лозы и других древесных растений проблематична из-за ее нестабильности, вследствие химического строения, а также присутствия полисахаридов, полифенолов, специфичных ферментативных белков и других соединений, которые способны связываются с РНК [4]. Надежность ПЦР в реальном времени во многом ограничивается наличием в растительных экстрактах ингибиторов активности обратной транскриптазы и/или полимеразы. Эти ингибиторы препятствуют обнаружению РНК вируса в пробе данным методом, даже если известно, что вирус присутствует в экстракте. Ткани древесных растений, особенно при выращивании в полевых условиях, содержат большее количество фенольных соединений и полисахаридов, которые обладают ингибирующей активностью [5, 6].

Целью данной работы было сравнение эффективности методов экстракции вирусных РНК из тканей растений винограда.

Объекты и методы исследований. Для идентификации РНК вирусов использовали молодые корни саженцев, пророщенных в воде в течении трех недель и молодые листья. Всего за время проведения исследования было отобрано 20 проб-образцов с растений, имеющих признаки поражения вирусными инфекциями.

Для анализа качества выделенной РНК для каждого образца была проведена оценка чистоты и концентрации с помощью спектрофотометра – NanoPhotometer® NP80 (IMPLEN Ink, Германия)

С полученной РНК была проведена серия ОТ-ПЦР с использованием набора MMLV kit, («ООО» Евроген, Россия), для получения кДНК, которая и была использована в реакции ПЦР-РВ с использованием набора qPCRMix-HS («ООО» Евроген, Россия) и интеркалирующего красителя SYBR Green □ («ООО» Евроген, Россия), концентрация которого оптимизировалась в соответствии с указанными в документации значениями. Протокол амплификации был следующим: 30 минут при 52 °С перед началом 45-ти циклов, начинающихся с 94 °С в течении 30 секунд, 58 °С в течении 45 секунд, и 72 °С в течении 60 секунд. Детекцию продуктов амплификации производили в режиме Реал-тайм ПЦР с использованием прибора Light Cycler 96 (ROCHE, Швейцария/Германия).

Для идентификации вирусных частиц были задействованы маркерные системы для идентификации вирусов: MDH (Контроль реакции) (MDH-H968 и MDH-C1163), ArMV (вирус листовой мозаики) (ARMV-H428 и ARMV-C867), RSPaV (вирус искривления древесины Ruprestis) (RSP-H5638 и RSP-C5992), GVA (бороздчатость древесины винограда) (GVA-H7038 и GVA-C7273), GVB (бороздчатость древесины винограда) (GVB-H698 и GVB-C7439) [7-9].

Амплификацию указанных маркеров проводили методом РВ-ПЦР, а также методом ПЦР с дальнейшей детекцией продуктов на агарозном геле.

Обсуждение результатов. Для выделения РНК из растительного материала винограда были использованы две различные методики. Методика СТАВ с использованием 10% β-меркаптоэтанола, 2,5- СТАВ буфера, 2%-PVP 40000, хлороформа выступала в этом исследовании в качестве контрольной [10].

Методика с использованием 0,5% SDS, 1% β-меркаптоэтанола, 1% PVP 40000, 20мг/мл протеиназы-К была модифицирована нами [11].

Следует отметить, что β -меркаптоэтанол является токсичным, вызывает раздражение дыхательных путей, кожи, боли в животе и обладает специфической избирательной токсичностью, поражающей отдельные органы-мишени при многократном воздействии [12]. По этой причине одной из задач было сокращение объемов использования данного вещества.

Для качественной и количественной оценки полученные препараты РНК были проанализированы на спектрофотометре NanoPhotometer® NP80 (IMPLEN Ink, Германия) (табл. 1).

Таблица 1 – Концентрация РНК и отношение показателей поглощения A260/A280, A260/A230 для каждого образца

Методика	Образец	Концентрация нг/мкл	A260/A280	A260/A230
Контрольная	1	47,13	2,117	2,312
Контрольная	2	17,671	1,993	2,17
Контрольная	3	59,2	2,009	2,441
Контрольная	4	70,35	2,091	2,119
Контрольная	5	9,861	1,978	2,321
Контрольная	6	7,988	1,678	2,021
Контрольная	7	67,391	2,079	2,332
Контрольная	8	43,86	2,103	1,718
Контрольная	9	4,138	1,609	1,01
Контрольная	10	51,405	2,119	2,301
Контрольная	11	8,116	1,951	2,221
Контрольная	12	23,561	2,071	1,514
Модифицированная	13	217,4	2,213	2,356
Модифицированная	14	253,4	2,17	2,32
Модифицированная	15	446,36	2,228	2,414
Модифицированная	16	41,76	2,113	1,818
Модифицированная	17	413,311	2,119	2,237
Модифицированная	18	291,103	2,16	2,278
Модифицированная	19	90,35	2,117	2,112
Модифицированная	20	79,2	2,049	2,431
Модифицированная	21	322,093	2,363	2,209

Отношение показателей поглощения A260/A280 является индикатором загрязнения белками: значение большее или равное 1,8 указывает на чистый образец ДНК. Таким образом все образцы кроме 6 и 9 можно считать свободными от белковых загрязнений.

Отношение показателей поглощения A260/A230 меньше 1,8 указывает на загрязнение, вероятно, вызванное органическими соединениями или хаотропными агентами, которые поглощают свет на длине волны 230 нм. Образцы 8, 9 и 12 оказались загрязнены органическими веществами.

По итогам исследования самая высокая концентрация РНК была зафиксирована в препаратах, полученных при помощи метода, включающего в себя β -меркаптоэтанол 1% из молодых листьев зараженной лозы, и составила 446.36 нг/мкл. Среднее значение среди всех образцов, выделенных этим методом, составило 239.441 нг/мкл.

Более токсичный контрольный метод, с применением β -меркаптоэтанола 10% позволил получить образец РНК с концентрацией 70.35 нг/мкл, при среднем значении концентрации 34.225 нг/мкл среди всех образцов, полученных этим методом.

Для подтверждения полученных данных на практике нами была проведена серия ПЦР в реальном времени с вышеуказанными маркерами. В результате проведенного РВ-ПЦР были получены целевые фрагменты, интенсивность флуоресценции которых выражается кривыми амплификации, показанными на рисунке 1.

Видно, что пороговый цикл образцов, что были получены с помощью модифицированного нами метода, наступает в среднем на 5 циклов раньше, что ещё раз доказывает уже подтверждённую [13-14] разницу в концентрации и её положительное влияние на образование ПЦР-продукта.

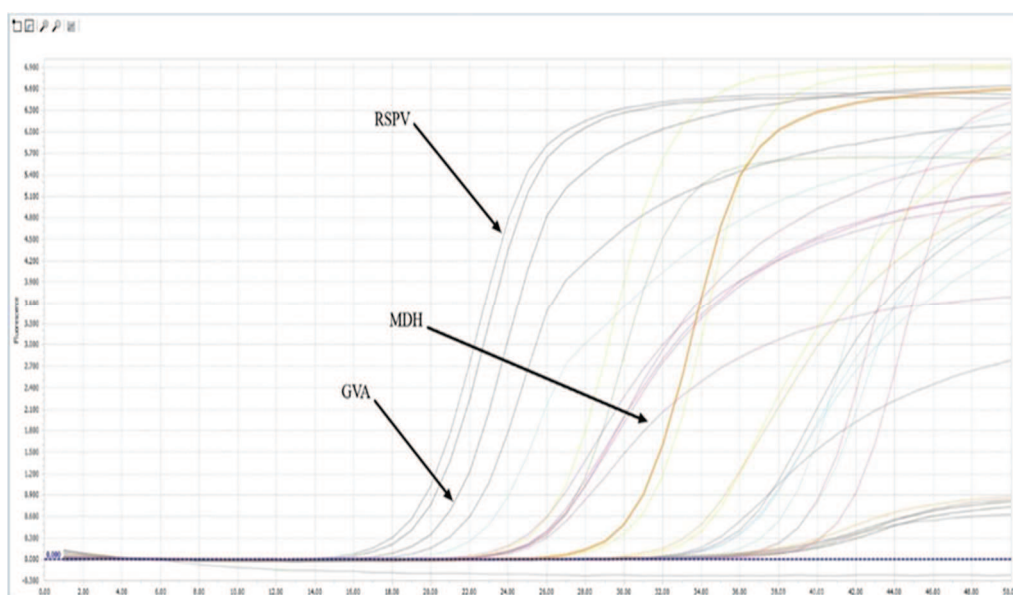


Рис.1. Кривые амплификации продуктов ПЦР вирусов бороздчатости древесины винограда (RSPV) и А вируса виноградной лозы (GVA), малатдегидрогеназы (MDH)

Для подтверждения накопления ПЦР-продукта нами был проведен электрофорез в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием, дающим флуорисценцию под действием ультрафиолета (рис.2).

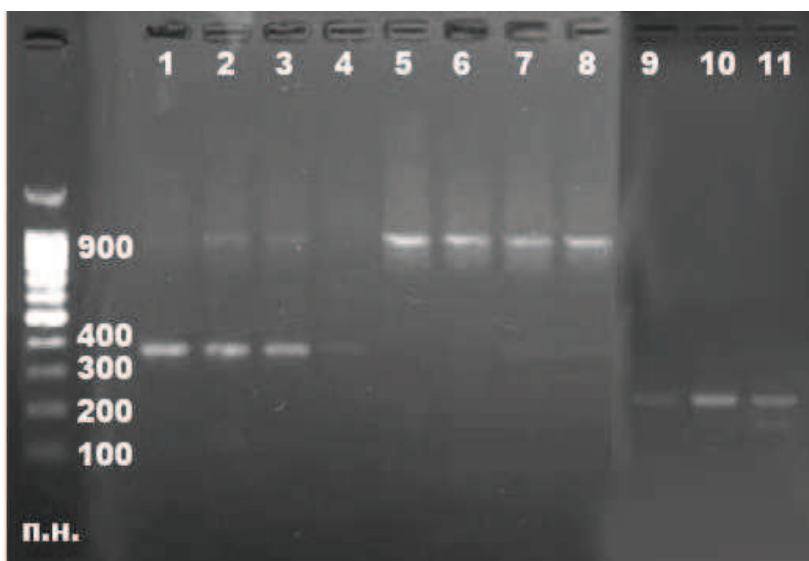


Рис. 2. Фотография геля-электрофореза с ПЦР-продуктами RSPaV и GVA

По результатам опыта, все образцы где в ходе ПЦР в реальном времени была зафиксирована флуоресценция содержали ПЦР-продукт соответствующей длины на агарозном геле (п.н.).

Выводы. Сравнение концентраций образцов РНК, полученных контрольным и модифицированным методом, доказало то, что модифицированный нами метод обеспечивает больший выход тотальной РНК нежели контрольный метод, что является важным параметром при идентификации вирусов винограда в растительном материале, в том числе в посадочном материале. Кроме того, модифицированный нами метод является менее токсичным по сравнению с контрольным, что является неоспоримым преимуществом для исследователя, проводящего рутинные анализы. Однако, стоит иметь в виду, что оба метода являются довольно трудозатратными, что может осложнить массовую идентификацию вирусов в саженцах винограда и взрослых растениях. Подбор оптимальных методик выделения РНК для массовых анализов будет продолжен.

Литература

1. Аникина И.Н. Фитовирусология: учебное пособие / И.Н. Аникина, Д.Д. Сейтжанова. Павлодар: Кереку. 2015. 104 с
2. Bertolini E., García J., Yuste A., Olmos, A. High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR // *European Journal of Plant Pathology*. 2010. №128(3). P. 283-287.
3. Bahder B. W., Zalom F. G., Jayanth, M., Sudarshana, M. R. (2016). Phylogeny of geminivirus coat protein sequences and digital PCR aid in identifying *Spissistilus festinus* as a vector of grapevine red blotch-associated virus // *Phytopathology*. 2016. № 106(10). P. 1223-1230.
4. Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants // *Phytochemical Analysis*. 2008. Vol. 19. №. 6. P. 520-525.
5. Monette P.L., James D. Detection of two strains of grapevine virus A // *Plant Dis*. 1990. №74. P. 898-900.
6. Bashalkhanov S., Rajora O. P. Protocol: A high-throughput DNA extraction system suitable for conifers // *Plant Methods*. 2008. Vol. 4. №. 1. P. 1-6.
7. Nassuth A. Pollari E., Helmechy K., Stewart S., Kofalvi S. A. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts // *Journal of Virological Methods*. 2000. Vol. 90. №. 1. P. 37-49.
8. Minafra A., Hadidi A. Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated virus III from viruliferous mealybugs and infected tissue // *J. Virol. Methods*. 1994. №47. P. 175-187.
9. John M.E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics // *Nucleic Acids Res*. 1992. №20. P. 2381.
10. Astruc N. Marcos J. F., Macquaire G., Candresse T., Pallás V. Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents // *European Journal of Plant Pathology*. 1996. Vol. 102. №. 9. P. 837-846.
11. MacKenzie D.J. A standard protocol for the detection of viruses and viroids using a reverse transcription-polymerase chain reaction technique // *The Canadian Food Inspection Agency*. 1997. Document СРНВТ-RTPCR1.00.
12. Паспорт безопасности: 2-меркаптоэтанол - Carl Roth [Путь доступа]: <https://www.carlroth.com> (дата обращения: 14.07.2021)
13. Белов Ю. В., Петров А. И., Лавров В. В., Курочкин В. Е. Особенности количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // *Научное приборостроение*. 2011. №21(1). С. 44-49.
14. Белов Ю. В., Петров А. И., Лавров В. В., Курочкин В. Е. Оптимизация параметров сигмоидальной функции при моделировании сигналов ПЦР в реальном времени // *Научное приборостроение*. 2011. №21(3). С. 130-134.