

ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

КОНТРОЛЬ ДОСТОВЕРНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ФИТОСАНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

Е.С. Мазурин^{1, 2}, М.Б. Копина², Н.А. Шероколава²

¹Кафедра генетики, растениеводства и защиты растений
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

²ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
ул. Пограничная, 32, пос. Быково, Раменский р-н,
Московская обл., Россия, 140150

Разработана система внутреннего контроля (ВК) прохождения ПЦР на основе фрагмента гена мыши, встроенного в вектор. Созданная система ВК позволила выбрать метод выделения ДНК из биоприманок, не ингибирующий процесс амплификации при диагностике *Phytophthora sp.* При диагностике возбудителя кольцевой гнили картофеля было показано, что разработанный ВК в режиме ПЦР «в реальном времени» оказался более информативным, чем при использовании в качестве ВК митохондриального гена растения-хозяина.

Ключевые слова: ПЦР, внутренний контроль, диагностика, карантинные организмы.

Современные представления о систематике организмов, полиморфизме популяции конкретных видов неразрывно связаны с изучением генома. Использование различных модификаций молекулярно-генетических методов позволяет точно идентифицировать вредные организмы не только до рода или вида, но в отдельных случаях даже до расы. Наибольшее распространение в настоящее время получила полимеразная цепная реакция (ПЦР), различные модификации которой являются необходимым условием для диагностики карантинных видов бактерий, вирусов и фитоплазм [5; 6].

К главным достоинствам ПЦР относятся высокая чувствительность и специфичность диагностики.

Но при несоблюдении правил организации лаборатории главное достоинство ПЦР может являться, напротив, существенным недостатком.

Так, способность ПЦР амплифицировать всего несколько молекул ДНК в пробе позволяет выявлять латентную инфекцию. Но в тоже время ПЦР может давать ложноположительный результат с ДНК, находящейся не в образце, а в помещении или на оборудовании.

Проблемы такого рода решаются грамотной организацией помещений, в которых проводится ПЦР-анализ, и системой отрицательных контролей, используемых при каждой постановке ПЦР.

Другой проблемой применения молекулярных методов диагностики в фитосанитарной карантинной экспертизе является неоднородность исследуемого материала.

Чаще всего экспертизу проходят разные части растений: корни, листья, стебли, семена, а также чистые культуры грибов, бактерий или экземпляры насекомых.

Известен тот факт, что ПЦР блокируется в присутствии определенных веществ: ферментов, ароматических соединений, спиртов, фенолов.

Количество ингибиторов в растительном материале сильно зависит от времени года, сорта растений и сроков доставки образцов на экспертизу. Ингибиторы ПЦР не позволяют получить положительный результат даже в присутствии ДНК целевого организма. Такие результаты принято называть ложноотрицательными.

Решение этой проблемы заключается в разработке положительного внутреннего контроля ПЦР, который показывает влияние веществ, содержащихся в образце, на эффективность амплификации. Такая реакция должна проходить даже в отрицательном контроле.

В качестве мишени для положительного внутреннего контроля (ВК) чаще всего используют ген цитохромоксидазы [11; 13] и рибосомные гены 18S rRNA [10; 13] растений-хозяев, в которых диагностируется вредный организм.

В качестве ВК при диагностике галловых нематод [7] было предложено использовать плазмиду, несущую ген зеленого флуоресцентного белка GFP [9]. К GFP плазмиде были подобраны праймеры и зонд, позволяющие проводить мультиплексную диагностику двух видов галловых нематод с использованием внутреннего положительного контроля.

На отечественном рынке имеются наборы для диагностики ряда фитопатогенов методом Flash-PCR. В состав этих наборов входит система ВК в каждой пробирке. Внутренний контроль состоит из плазмидного вектора и зонда. Вектор содержит вставку, отличающуюся от специфического фрагмента, но имеющую на концах участки, комплементарные специфическим праймерам [4].

Использование в качестве положительного внутреннего контроля генов растений-хозяев дает нестабильные результаты, так как варьирует концентрация мишени. Технологии, используемые в диагностических наборах, являются коммерческой тайной. Поэтому основной целью нашей работы была разработка собственной системы внутреннего положительного контроля и проверка достоверности проведения диагностики карантинных организмов методом классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени».

Материалы и методы. Для разработки ВК было выбрано две мишени. Одна из них была в геноме бактерий, другая в геноме мыши. В случае с использованием бактериальной ДНК праймеры были специфичны к гену 16S rRNA большинства бактерий [2]. Добавлять саму мишень для ВК не требовалось, так как ДНК бактерий присутствует даже в автоклавированной воде [3].

Данный ВК контроль был использован при диагностике возбудителя ожога плодовых культур с коммерческим набором (Loewe, Германия).

Для разработки внутреннего контроля с ДНК мыши был использован фрагмент гена 1700042G15Rik (www.ncbi.nlm.nih.gov) некодирующей РНК. Последовательность этого гена сильно отличалась от последовательности карантинных вредных организмов.

Подбор праймеров и зондов проводили с помощью программы Primer 3 и Primer Express v.3.0. Полученный продукт амплификации был очищен при помощи колонок (Fermentas, США) и клонирован по стандартной методике.

Полученный ампликон лигировали в вектор pTZ57R/T (Fermentas, США) и клонировали в клетках *Escherichia coli* (штамм DH10P).

Бело-голубую селекцию клонов проводили на среде LB с добавлением X-GAL, IPTG и ампициллина согласно инструкции производителя (Fermentas, США). Выросшие белые колонии проверяли на наличие вставки методом ПЦР и секвенированием с использованием праймеров M13pUC и M13pUC5 (Fermentas, США).

После получения плазмид с вставкой подбирали их оптимальную концентрацию в классической ПЦР при детекции вируса шарки сливы с праймерами P2/P1 по стандартной методике [5].

Условия амплификации были оптимальны для диагностики вируса шарки сливы.

Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000. Для постановки ПЦР «в реальном времени» с одновременным прохождением ВК к вставке были подобраны праймеры и зонд, меченный красителем R6G (Синтол, Москва).

Выделение ДНК проводили из листьев малины – биоприманок, зараженных *Phytophthora cactorum* по методике С.Е. Головина [1]. ДНК выделяли различными способами: с использованием наборов Проба-ГС (ДНК-Технология, Москва), ДНК-Экстрен (Синтол, Москва), Сорб-ГМО-А (Синтол, Москва), Сорб-С (Синтол, Москва), с использованием методики ChL+СТАВ (<http://pcr-rus.narod.ru/protocols.html>), LiCl 8M+СТАВ с добавлением 100 мкл LiCl после этапа инкубации, 2xChL+СТАВ с добавлением хлороформа на 50% больше после этапа инкубации, с использованием методики к набору «Loewe» *Phytophthora fragaria* [8] и согласно инструкции производителя к набору «Loewe» *Phytoplasma*. ПЦР проводили совместно с праймерами Yph1F_Yph2R [12], амплифицирующими продукт размером 370 п.о. всех видов *Phytophthora sp.*

Условия амплификации были оптимальны для диагностики *Phytophthora sp.*

Для клонированного фрагмента гена 1700042G15Rik подбирали праймеры и пробу, меченную с 5'-конца источником флуоресценции R6G и с 3'-конца — гасителем RTQ2 (Синтол, Москва).

Разработанный нами ВК был использован при диагностике кольцевой гнили по методике W. Schaad (1999) [11] в образцах картофеля, проходящего фитосанитарную экспертизу.

Для сравнения был использован ВК к гену цитохромоксидазы картофеля (COX), предложенный авторами [11].

ПЦР «в реальном времени» проводили на амплификаторе iCycler IQ 5 (Bio-Rad, США).

Оптимизированы концентрации праймеров, пробы и плазмиды таким образом, чтобы при обычных условиях амплификации (без ингибирования) значение порогового цикла (Ct) было в пределах 25—26 циклов.

Результаты и обсуждение. В результате проведенной работы была оптимизирована методика проведения ПЦР при диагностике *Erwinia amylovora* методом классической ПЦР с ВК к гену 16S rRNA большинства бактерий.

В серии проведенных экспериментов было показано, что праймеры, используемые в работе, приводили к невоспроизводимым результатам. В отдельных реакциях ВК амплифицировался очень слабо, в других случаях слишком сильно. Это зависело от вида растения, сорта и качества пробоподготовки, что, в конечном счете, влияло на количество бактериальной ДНК в экстракте. Использование ВК к гену 16S rRNA большинства бактерий оказалось непригодным для диагностики возбудителя ожога плодовых культур.

Для разработки ВК с использованием гена мыши были сконструированы 4 пары праймеров, из которых пара Mus 714F_ Mus 714R была признана наиболее подходящей. Для этой пары праймеров была определена оптимальная температура отжига (рис. 1).

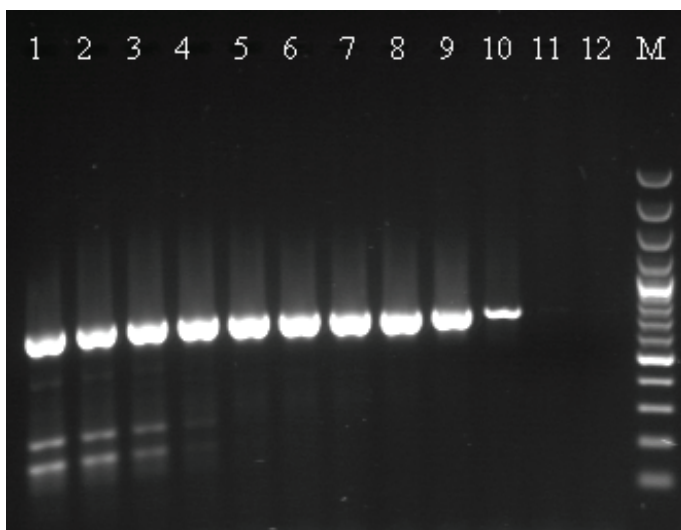


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК гена 1700042G15Rik мыши с праймерами Mus 714F_ Mus 714R (размер продукта 714 п.о.) при различной температуре отжига:

дорожка № 1 — 47,8 °С; дорожка № 2 — 48,3 °С; дорожка № 3 — 49,5 °С; дорожка № 4 — 51,4 °С;
дорожка № 5 — 53,7 °С; дорожка № 6 — 56,4 °С; дорожка № 7 — 59,1 °С; дорожка № 8 — 61,7 °С;
дорожка № 9 — 64,1 °С; дорожка № 10 — 66,1 °С; дорожка № 11 — 67,4 °С; дорожка № 12 — 68,0 °С

Как видно из рис. 1, температура отжига в пределах 53,7—64,1 °С позволяла амплифицировать продукт ПЦР хорошего качества размером 714 п.о. Указанный выше интервал температур отжига праймеров соответствует широкому кругу программ амплификации для разных карантинных объектов.

Можно предположить, что разработанный ВК будет универсальным для диагностики методом классической ПЦР многих объектов при проведении оптимизации параметров амплификации в каждом конкретном случае.

Оптимизация концентрации полученной плазмиды при детекции вируса шарки сливы представлены на рис. 2. Было показано, что плазмиды в концентрации 0,1 нг/реакцию было достаточно для амплификации ВК, и она не мешала проведению специфической амплификации с геном белка оболочки (СР) вируса шарки сливы. Конечная концентрация каждого из праймеров для ВК при этом составляла 0,4 мкМ.

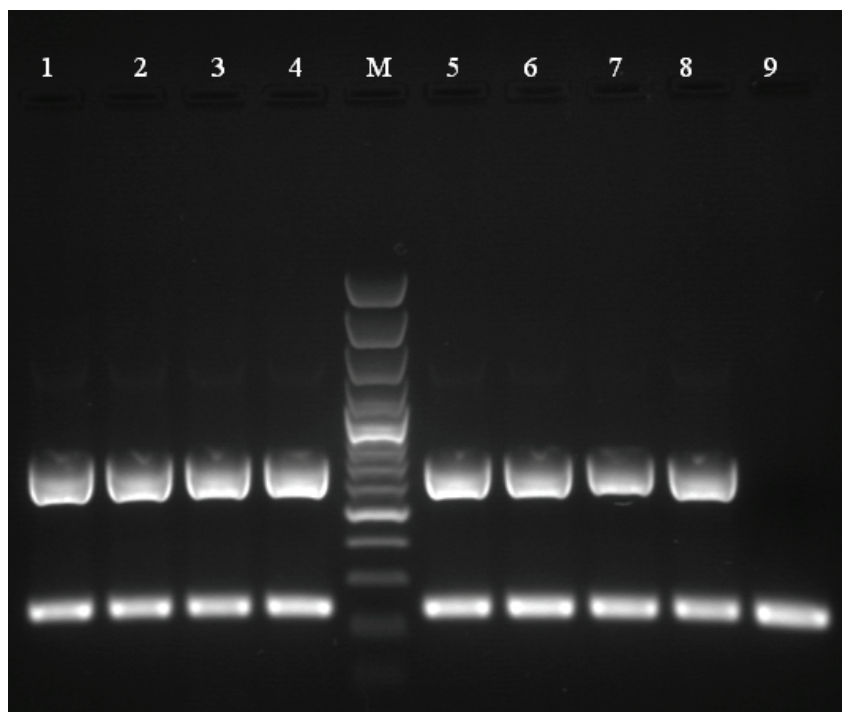


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена белка оболочки (СР) вируса шарки сливы (243 п.о.) и гена 1700042G15Rik мыши (714 п.о.) при различной концентрации плазмиды:

дорожка № 1 — 100 нг; дорожка № 2 — 50 нг; дорожка № 3 — 20 нг; дорожка № 4 — 10 нг;
дорожка № 5 — 5 нг; дорожка № 6 — 1,0 нг; дорожка № 7 — 0,5 нг;
дорожка № 8 — 0,1 нг; дорожка № 9 — 0 нг

Результаты классической ПЦР с выделением ДНК различными способами из зараженных биоприманок представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, в большинстве образцов наблюдалось ингибирование ПЦР.

Несмотря на то, что все биоприманки были заражены *Ph. cactorum*, полосы размером 370 п.о. отсутствовали при выделении ДНК некоторыми способами.

Амплификации ВК также не наблюдалось, что свидетельствует о наличии ингибирования и получении ложноотрицательных результатов в дорожках № 1—14.

Выделение ДНК с использованием протоколов к набору «Loewe» *Phytophthora fragariae* и к набору «Loewe» *Phytoplasma* позволили получить достоверные данные о зараженности биоприманок фитофторозом.

Использование ВК является необходимым условием при проведении экспертизы биоприманок.

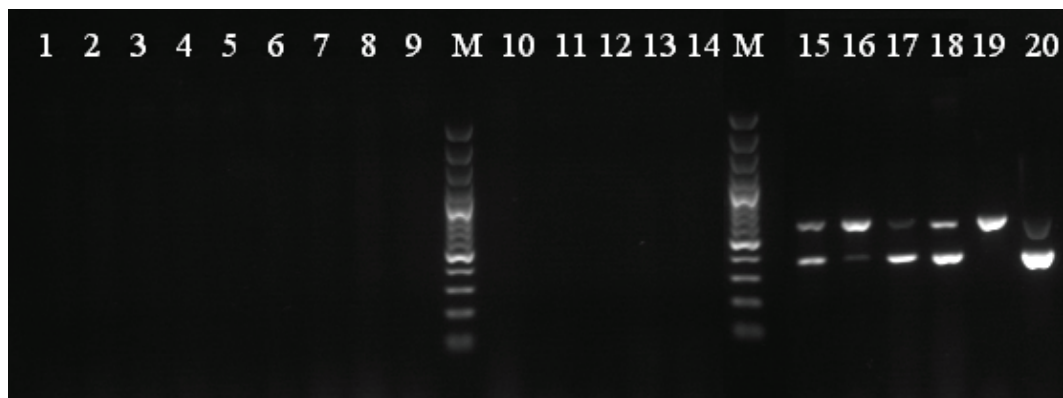


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Yph1F_Yph2R (370 п.о.) и ВК при различных методах выделения ДНК из биоприманок:

дорожки 1, 2 — ChL+СТАВ; 3, 4 — LiCl 8M+СТАВ; 5, 6 — 2xChL+СТАВ; 7, 8 — «ДНК-Экстран»; 9, 10 — «Проба ГС»; 11, 12 — «Сорб-ГМО-А»; 13, 14 — «Сорб-С»; 15, 16 — «Loewe» *Phytophthora fragariae*; 17, 18 — «Loewe» *Phytoplasma*; 19 — вода; 20 — положительный контроль

Для исключения ложноотрицательных результатов при проведении ПЦР «в реальном времени» проводили сравнение работы двух систем ВК при диагностике возбудителя кольцевой гнили картофеля. Результаты данной работы представлены в табл. 1.

Таблица 1

Контроль эффективности ПЦР «в реальном времени» при диагностике возбудителя кольцевой гнили картофеля с использованием двух систем ВК

Шифр образца	Значения пороговых циклов (C_t)	
	ВК COX [11]	ВК к гену мыши
511	N/A*	N/A
513	N/A	N/A
516	N/A	N/A
518	N/A	N/A
523	N/A	N/A
735	22,4	25,8
736	24,9	26,2
737	26,1	25,6
738	24,1	26,2
744	23,5	26,1
здоровый экстракт картофеля	21,5	26,6
зараженный экстракт картофеля	25,6	26,4
Коэффициент вариации, %**	10,1	0,37

Примечания: *N/A — отсутствие сигнала флуоресценции на 40-м цикле амплификации. **Статистическая обработка проведена для вариантов, в которых не наблюдалось ингибирования амплификации.

Как видно из табл. 1, в образцах 511, 513, 516, 518, 523 наблюдалось ингибирование ПЦР, что подтверждалось данными при использовании двух систем ВК. В остальных образцах ингибирование ПЦР отсутствовало.

При использовании ВК COX можно было наблюдать варьирование C_t в пределах 22—26 циклов, тогда как при использовании гена мыши варьирование наблюдалось в пределах 25—26 циклов. При сравнении коэффициентов вариации видно, что более воспроизводимые результаты были получены при использовании гена мыши в качестве ВК.

Полученные данные позволяют предположить, что разработанная система ВК может обнаруживать незначительное ингибирование в образцах, что также немаловажно при проведении фитосанитарной экспертизы.

Выводы. Разработанная нами система ВК с искусственно внесенным вектором, содержащим ген мыши, позволила исключать ложноотрицательные результаты в классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени». Испытание разработанного ВК в ПЦР «в реальном времени» позволило получить более однородные результаты, которые, в свою очередь, могут позволить выявлять даже незначительное влияние побочных продуктов выделения ДНК на эффективность амплификации.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Головин С.Е. Методические указания по диагностике и учету болезней корней и стеблей земляники и малины, передающихся через почву. — М.: ВСТИСП, 2001.
- [2] Джалилов Ф.С., Мазурин Е.С., Игнатов А.Н. Усовершенствование методики диагностики зараженности семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза. — Сборник трудов международной научно-практической конференции «Агротехнологии XXI века». — М.: РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. — С. 73—75.
- [3] Мазурин Е.С. Методы диагностики возбудителя сосудистого бактериоза капусты и меры защиты: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — М., 2009.
- [4] Рязанцев Д.Ю., Абрамов Д.Д., Дробязина П.Е. и др. Диагностика ряда фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов при помощи диагностических наборов производства ООО «АгроДиагностика». Методические указания. — М., 2009.
- [5] Diagnostic protocols for regulated pest. Plum Pox potyvirus // Bulletin OEPP/EPPO. — 2004. — Vol. 34. — P. 247—256.
- [6] Diagnostic protocol for *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* // Bulletin OEPP/EPPO. — 2006. — Vol. 36. — P. 111—115.
- [7] Diagnostic protocol for *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne falla* // Bulletin OEPP/EPPO. — 2009. — PM 7/41 (2). — Vol. 39. — P. 5—17.
- [8] Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. Life technolog. inc. — 1990. — V. 12. — P. 13—15.
- [9] Klerks M.M., Zijlstra C., van Bruggen A.H.C. Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* 0157:H7 and quantification using a general internal amplification control // Journal of Microbiological Methods. — 2004. — Vol. 59. — P. 337—349.
- [10] Pastrik K.H., Elphinstone J.G., Pukall R. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control // European Journal of Plant Pathology. — 2002. — Vol. 108. — P. 831—842.
- [11] Schaad W., Berthier-Schaad Y., Sechler A., Knorr D. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system // Plant Disease. — 1999. — Vol. 83. — P. 1095—1100.
- [12] Schena L., Duncan J.M., Cooke D.E.L. Development and application of a PCR-based “molecular tool box” for the identification of *Phytophthora species* damaging forests and natural ecosystems // Plant Pathol. — 2007. — Vol. 57. — P. 64.
- [13] Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — Vol. 66. — P. 2853—2858.

**CONTROLLING THE RELIABILITY
OF RESULTS RECEIVED DURING LABORATORY TESTING
FOR PHYTOSANITARY PURPOSES WHEN MOLECULAR
DIAGNOSTIC METHODS ARE USED**

**E.S. Mazurin^{1,2}, M.B. Kopina²,
N.A. Sherokolava²**

¹Department of genetics, crop production and plant protection
Peoples' Friendship University of Russia
Miklucho-Maklay str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

²All-Russian Plant Quarantine Center
*Pogranichnaya, 32, Vykovo, Ramenskoe,
Moscow region, 140150, Russia*

An internal PCR control system based on a mouse gene fragment cloned into a vector was developed. The created internal control system allowed for choosing a method for DNA extraction from bio-baits which doesn't inhibit the amplification process when *Phytophthora* sp. is being diagnosed. During the process of diagnosing the pathogen of the ring rot of potato, it was shown that the developed internal control in real-time PCR turned out to be more informative than the mitochondrial gene of a host plant used for that purpose.

Key words: PCR, internal control, diagnostics, quarantine organisms.