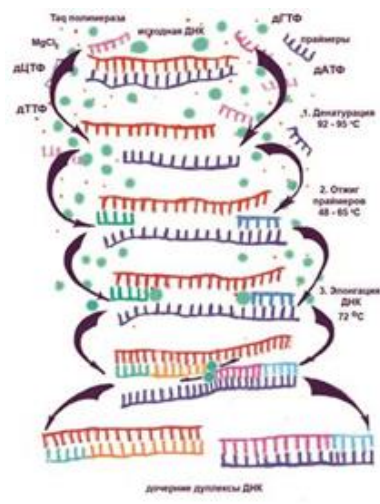


ОСНОВЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

Методические указания по курсу «Фитопатология»
для студентов 4 курса (направление «Биология»)



Печатается по решению кафедры биохимии и биотехнологии,
протокол № 16 от 13 мая 2016 г.

Составители: д-р. биол. наук, доцент **Л.Г. Яруллина,**
д-р. биол. наук, профессор **Р.И. Ибрагимов**

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Основы современных методов высокоэффективного тестирования патогенов	5
2. Метод ПЦР	7
2.1. Стадии прохождения ПЦР	9
2.2. Выделение ДНК и РНК из растительного материала	12
2.3. Компоненты смеси для проведения ПЦР	13
2.5. Классификация и подбор праймеров	17
2.6. Способы постановки ПЦР	18
2.7. Контроль за прохождением реакции амплификации	22
2.8. Визуализация результатов амплификации	24
2.9. Проблема контаминации	27
3. Лабораторные занятия	29
3.1. Лабораторная работа «Выделение ДНК из растительных тканей»	29
3.2. Лабораторная работа «Выделение ДНК из мицелия чистых культур грибов»	30
3.3. Лабораторная работа «Выделение ДНК из пораженных растений»	31
3.4. Лабораторная работа «Выделение РНК с помощью гуанидинтиоцианата и тризола»	33
3.5. Лабораторная работа «Амплификация ДНК и визуализация продуктов ПЦР»	34
Список литературы	37

Введение

Болезни сельскохозяйственных растений, вызываемые микроскопическими грибами, наносят существенный ущерб урожаю и приводят к экономическим потерям. Применение интенсивных технологий при возделывании зерновых культур зачастую приводит к ухудшению фитосанитарной ситуации не только с наиболее распространенными и вредоносными патогенами, но также способствует расширению ареала и увеличению вредоносности возбудителей. Для своевременного применения средств защиты растений от болезней и контроля зараженности зерна фитопатогенными грибами на разных стадиях его производства и переработки необходима их детекция и точная идентификация возбудителя.

В полевых условиях предварительный диагноз болезней, вызываемых фитопатогенными грибами, ставят по проявлению симптомов заболевания. Основой фитопатологического анализа является диагностика болезней по внешним признакам ослабления/повреждения растений на основе прямой визуальной оценки. По состоянию и анатомо-морфологическим изменениям растений, особенностям проявления симптомов часто удаётся определить только тип болезни (ржавчину или пятнистость листьев, инфекционное полегание сеянцев, корневую гниль и др.), без установления точных причин ее вызвавших и идентификации возбудителя заболевания.

Для более достоверной диагностики заболеваний выполняют микроскопическое исследование пораженных тканей с целью обнаружения патогенного микроорганизма и его идентификации по структуре мицелия и плодовых тел, особенностям спороношения в лабораторных условиях. Микроскопический метод является наиболее распространенным в практике специализированных лабораторий. Точную идентификацию возбудителя проводят главным образом по морфологии спор и другим морфолого-культуральным признакам патогена с применением методов микроскопии и культивирования на питательных средах. Однако морфологические характеристики спор у близкородственных видов микромицетов могут совпадать, а внутри одного вида значительно варьировать. Кроме того, симптомы болезни могут проявляться нетипично или заболевание может проходить в скрытой форме. В случае затруднения прямой микроскопической диагностики болезней данный метод дополняют микологическим – пересевом фитопатогенных организмов из растительных тканей на специальные искусственные питательные среды – создание культур изолятов *in vitro*. Недостатками исследования фитопатогенов путем посева инфекционного начала в чистую культуру являются длительность исследований, их трудоемкость и отсутствие специфических сред для каждого конкретного вида возбудителя болезни. Следует также отметить, что некоторые виды облигатных паразитов не способны произрастать в

искусственных условиях или требуют для роста многокомпонентные селективные среды, сложные в приготовлении. Кроме того, некоторые грибные организмы в культуре могут терять стадию полового процесса, что делает данные культуры непригодными для видовой идентификации.

Применение более чувствительных методов является актуальным и востребованным в диагностике фитопатогенов. В последние годы для идентификации и детекции фитопатогенных микроорганизмов все чаще применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Он превосходит традиционные методы по специфичности, чувствительности, скорости проведения анализа, производительности, и служит их существенным дополнением. На текущий момент наиболее современными и перспективными способами диагностики и видовой идентификации болезнетворных микроорганизмов являются методы, основанные на применении технологий молекулярной генетики. Общие принципы диагностики возбудителей инфекционных заболеваний сводятся к выявлению генетического материала патогена в тканях хозяина или образцах почвы, воды, воздуха, соскобах, пыли и др. с помощью специфических реактивов и оборудования.

1. Основы современных методов высокоэффективного тестирования патогенов

Современный метод высокоэффективного тестирования патогенов, в том числе и фитопатогенов, основан на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Простота, высокая чувствительность и специфичность, хорошая воспроизводимость результатов анализов быстро превратили этот подход в один из наиболее перспективных диагностических методов. В отличие от традиционных и серологических методов анализа, дающих только опосредованное свидетельство наличия инфекции (например, сведения о наличии белков-антигенов диагностируемых патогенов), метод ПЦР напрямую доказывает присутствие возбудителя инфекции, специфически выявляя наличие конкретной последовательности нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) обнаруживаемого патогена. Кроме того, метод ПЦР, благодаря своей высокой чувствительности, позволяет выявлять единичные копии геномов патогенов, обнаруживая тем самым их наличие тогда, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать практически невозможно. Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и скрыто существующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях. ПЦР-технологии, как правило, позволяют избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях. Кроме того, использование метода ПЦР позволяет значительно сократить время анализа образца. За счет автоматизации процесс амплификации

занимает всего 1 - 2 часа, а с учетом предшествующей пробоподготовки и регистрации результатов анализа, весь процесс занимает не более 4 часов. Помимо всего выше перечисленного, существенным достоинством метода является возможность осуществлять количественное определение возбудителя в модификации метода ПЦР в реальном времени.

Высокая чувствительность ПЦР является как преимуществом, так и недостатком метода, создавая ряд проблем, одной из которых является высокая вероятность появления ложноположительных и ложноотрицательных данных. Кроме того, корректность проводимых ПЦР-тестов в значительной степени зависит от адекватности методов выделения нуклеиновых кислот из растительного материала; чувствительность детекции зависит от влияния присутствующих в растительном материале ингибиторов ПЦР.

Все это усложняет процедуру ПЦР-детекции, требуя постановки дополнительных контрольных тестов или использования модификаций метода ПЦР. При молекулярной диагностике фитопатогенных грибов, вирусов и бактерий применяют следующие модификации ПЦР: метод конкурентной ПЦР, кооперативной ПЦР (Co-PCR), ПЦР-гибридизация *in situ* с использованием флуоресцентных зондов, мультиплексной ПЦР, метод множественной (или групповой) мультиплексной ПЦР (multiplex nested RT-PCR), метод ПЦР в реальном времени (real-time PCR).

Наиболее перспективным для диагностических лабораторий, проводящих рутинные анализы, являются методы ПЦР в формате FLASH (FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization) или в формате реального времени. Оба формата основаны на флуоресцентной детекции продуктов амплификации. Оба формата позволяют регистрировать результаты ПЦР непосредственно во время (ПЦР в формате реального времени) или после проведения реакции (ПЦР в формате FLASH), без открывания пробирок, благодаря чему решается проблема контаминации, упрощаются требования к организации ПЦР-лаборатории, значительно снижается трудоемкость и время проведения стадии детекции. Методы обеспечивают также возможность простой и эффективной документации и хранения результатов ПЦР в компьютерной базе данных. Другим примером применения молекулярных методов для диагностики фитопатогенов, основанных на ПЦР и включающих гибридизацию, является весьма перспективный, но пока только развивающийся метод биочипов. Преимущества использования биочипов состоят в следующем: биочип дает возможность проведения множественного параллельного исследования биологических объектов (тысячи ячеек на 1 см²); он миниатюрен, что обеспечивает удобство эксплуатации, экономию реактивов и т. д.; биочип универсален и дешев, так как одна технологическая схема обеспечивает производство различных микрочипов; в биочипе можно использовать в

качестве иммобилизованных зондов фрагменты ДНК, РНК, белков (с сохранением ферментативных и антигенных свойств), а также клеток - биосенсоров.

Таким образом, современные, доступные для широкого круга потенциальных потребителей технологии диагностики и идентификации фитопатогенов базируются, в основном, на двух технологиях – ИФА (иммуноферментный анализ) и ПЦР, которые постоянно совершенствуются в плане чувствительности, надежности и простоты применения. Кроме того, в настоящее время существует тенденция использования комплекса методов, включающих как традиционные (микроскопия, селективные среды, патогенность и т.п.), так и современные серологические и молекулярные тесты. Таким образом, существующие способы диагностики фитопатогенов постоянно усовершенствуются, появляются новые методы.

Усовершенствование методов секвенирования и создание электронных баз данных, хранящих информацию о структуре геномов различных фитопатогенов дает возможность (при разработке видоспецифичных праймеров) наиболее полно учитывать и использовать вариабельность анализируемых последовательностей нуклеотидов. Это обеспечивает высокую специфичность диагностическим системам, создаваемым на их основе.

Применение высокочувствительных и специфичных методов детекции, позволяющих диагностировать патогены в низкой концентрации, что особенно важно в случае контроля растительного материала на наличие карантинных патогенов. Поэтому в помощь, а сегодня все чаще на смену традиционным методам, в практику контроля фитосанитарного состояния сельскохозяйственных растений и продуктов их переработки приходят молекулярные технологии. Это позволяет значительно повышать специфичность анализов и обеспечивать высокую чувствительность.

2. Метод ПЦР

ПЦР — это ферментативная реакция, в результате которой происходит накопление большого количества копий какого-либо не слишком большого (чаще всего, 200–1500 пар нуклеотидов) фрагмента ДНК. Так как ДНК любого организма содержит как вариабельные (отличающиеся даже у близкородственных организмов), так и консервативные (сходные у эволюционно далёких видов) участки, возможно на основе выбора диагностического участка варьировать специфичность протекающей реакции. Таким образом, данный метод позволяет обнаруживать последовательности нуклеиновой кислоты, специфичные для конкретного организма или группы сходных организмов и, тем самым, выявлять их присутствие в анализируемой пробе. Американский ученый Кэрри Мюллис в

1993 году за открытие метода ПЦР был удостоен Нобелевской премии в области химии.

Процедура молекулярно-фитопатологической диагностики состоит из следующих стадий:

- выделение суммарной ДНК из инфицированных растений,
- амплификация локусов грибной ДНК методом ПЦР,
- секвенирование (расшифровка структуры амплифицированных локусов),
- идентификация (сравнительный анализ в базе данных).

Методы, основанные на ПЦР, позволяют идентифицировать патогенные виды, как в чистой культуре, так и непосредственно в растительном материале, минуя этап изоляции грибов. В качестве примера на рис. 1 приведены результаты ПЦР по идентификации грибов рода *Septoria*, представители которого являются возбудителями пятнистости злаков, в частности — пшеницы.

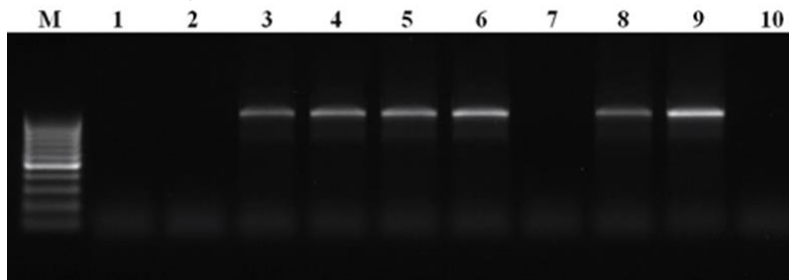


Рис. 1. Электрофорез продуктов ПЦР, разработанной для идентификации грибов рода *Septoria*. М — маркеры (набор фрагментов ДНК известного размера), 1–10 — ДНК, выделенная из различных пораженных образцов пшеницы.

Фрагменты ДНК известного размера должен наблюдаться только в том случае, если в образце присутствует ДНК определяемого микроорганизма, а именно — гриба рода *Septoria*. Таким образом, растения пшеницы под №№3,4,5,6,8,9 заражены возбудителем септориоза (рис. 1).

Существует достаточно много модификаций метода ПЦР, большинство из которых применяется в изучении возбудителей болезней растений. Так RAPD (Random Amplified Polymorphic) и RFLP (Restrictions Fragment Length Polymorphism) анализы используются для уточнения родственных связей между различными грибами; ПЦР с регистрацией в режиме реального времени (real-time PCR) — для определения количества присутствующей целевой ДНК. В отличие от большинства других

форматов ПЦР, он позволяет не только констатировать факт присутствия ДНК целевого патогена, но и измерить её количество.

2.1. Стадии прохождения ПЦР

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов: 1 - денатурации (расплетение двойной цепи ДНК, находящейся в образце), 2 - отжиг (присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК - мишени), 3 - элонгация (синтез 2 - ой цепи ДНК с максимальной эффективностью) (рис. 2).

На первой стадии при температуре 94 °С (или выше) происходит денатурация двойной цепи исследуемой ДНК (*стадия денатурации*). На второй стадии два олигонуклеотида-праймера, строго специфичные (гомологичные) к определенным участкам антипараллельных цепей исследуемой ДНК, связываются (образуют гибриды с помощью водородных связей) с этими участками ДНК (*стадия отжига*). Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомым фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в 2-х цепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а гуанина - цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

Температуру отжига по последовательности праймеров рассчитывают по формуле:

$$2(A+T)+4(G+C) - 5.$$

На третьей стадии (*стадия элонгации*) температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq - полимеразы (70-72 °С), и синтез 2 - ой цепи продолжается с максимальной эффективностью. Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз) на каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Инициация синтеза ДНК происходит в местах связывания олигонуклеотидов-праймеров с исследуемой ДНК, матрицей для синтеза служат исходные цепи ДНК. Taq - полимеразы начинают достраивание 2 - ой цепи с 3' - конца праймера

Таким образом, за цикл, включающий три стадии, происходит удвоение каждой из двух антипараллельных цепей ДНК. При проведении 20 таких циклов теоретически происходит увеличение количества исходной ДНК в миллион и более раз.

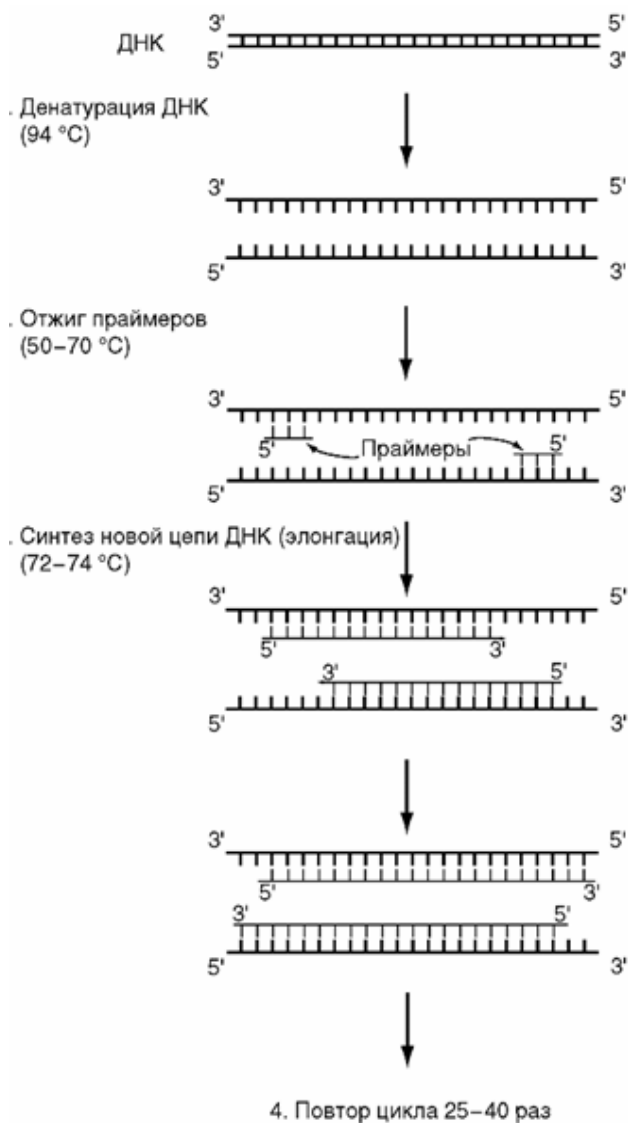


Рис. 2. Схема прохождения ПЦР.



Рис. 3. Многоканальный амплификатор «Герцик».

Наличие специфического продукта ПЦР (**ампликона**) в подавляющем большинстве случаев детектируют методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и положительному ДНК-контролю. Дополнительные доказательства специфичности ампликона получают методами рестрикционного анализа, гибридизации и прямого секвенирования.

Основным достоинством метода ПЦР является чрезвычайно высокая чувствительность анализа - до 1 копии геномной ДНК возбудителя инфекции в исследуемой пробе в "nested"-варианте ПЦР (с "внутренней" и "внешней" парами олигонуклеотидов-праймеров). Чувствительность выявления ДНК в ПЦР с одной парой праймеров составляет обычно 30-100 копий генома в исследуемой пробе.

Для ПЦР-анализа РНК-содержащих инфекционных агентов (например, фитопатогенных грибов) предварительно проводят стадию обратной транскрипции - получения ДНК, комплементарной грибной РНК-матрице, для чего используют специфические праймеры к РНК и фермент - РНК-зависимую ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу, ревертазу). Далее ПЦР-анализ проводят по схеме, описанной выше (рис.).

Возможности, заложенные в методе ПЦР, позволяют, с одной стороны, достигать максимальной специфичности анализа, т.е. отсутствия перекрестных реакций и способности выявлять ДНК конкретного инфекционного агента в присутствии ДНК других микроорганизмов и ДНК организма-хозяина, а также проводить генотипирование. С другой стороны, соответствующий выбор олигонуклеотидов-праймеров, в основном определяющих специфичность анализа, позволяет одновременно выявлять ДНК близкородственных микроорганизмов.

Другим достоинством метода является то, что для ПЦР-диагностики практически всех инфекционных заболеваний может быть использован

один набор оборудования, универсальные процедуры подготовки пробы и постановки анализа, а также незначительно отличающиеся (в основном структурой олигонуклеотидов-праймеров) наборы реактивов. К настоящему времени метод автоматизирован и позволяет, при необходимости, получать результаты анализа в течение одного рабочего дня

2.2. Выделение ДНК и РНК из растительного материала

Так как ПЦР является эффективным, быстрым и недорогим методом амплификации ДНК, то и методы ее выделения для ПЦР должны быть достаточно простыми и надежными, чтобы этот этап не явился лимитирующим.

В зависимости от поставленной задачи и имеющихся ресурсов подбирается соответствующий метод выделения из растительного материала геномной ДНК. В настоящее время существует три наиболее распространенных способа выделения растительной ДНК. Первый, с использованием протеолитического фермента – протеиназы К в присутствии денатурирующего анионного детергента – додецилсульфата натрия (SDS); второй способ с применением катионного детергента – цетилтриэтиламмоний бромид (*СТАВ*) и, третий способ – с использованием щелочи. Необходимо отметить, что для ПЦР, как правило, не требуется высокая степень очистки ДНК.

ДНК можно выделять из любой растительной ткани: проростков, корней, листьев, зародышей, эндосперма, пыльцы и др. Количество выделенной ДНК зависит, в основном, от типа ткани и размера генома. Гомогенизацию растительного материала осуществляют в эппендорфе стеклянными палочками, отшлифованными под форму пробирок.

Методы выделения ДНК и РНК в принципе не различаются, варьируют лишь некоторые методологические приемы. Для выделения РНК проводят лизис клеток, депротенинизацию клеточного лизата и отделение РНК от ДНК. Однако РНК по сравнению с ДНК гораздо более лабильна и чувствительна к действию нуклеаз. Кроме того, РНКазы менее чувствительны к действию денатурирующих белки веществ, чем ДНКазы. Все это затрудняет получение полноразмерной РНК и заставляет проводить инактивацию РНКаз одновременно с лизисом. Обычно молекулы РНК имеют небольшой размер, так что можно не очень опасаться их механической деградации и интенсивно смешивать клеточный лизат с ингибиторами или инактиваторами РНКаз. Необходимо также принять все меры предосторожности для предотвращения случайного попадания РНКаз из других источников. Значительные количества РНКаз находятся на нашей коже, поэтому выделение РНК следует проводить в одноразовых перчатках.

2.3. Компоненты смеси для проведения ПЦР

Несомненным достоинством ПЦР является быстрота и точность диагностики. ПЦР – это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул, что позволило ему быстро распространиться в сферу практического и клинического использования.

В настоящее время развиваются всевозможные модификации ПЦР, разрабатываются новые амплификационные технологии, основанные на клонировании ДНК и РНК-фрагментов.

Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermis aquaticus*, оптимум работы которой находится в области 70-72°C, позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим и использовать его для работы *in vitro*.

При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК копий для идентификации их методом электрофореза.

Комплементарное достраивание цепи начинается не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках - коротких двунитевых участках. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направить процесс синтеза новой цепи только в этом участке, а не по всей длине ДНК цепи. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (20 нуклеотидных пар), называемые праймерами. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

Таким образом, ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК катализируемое ферментом ДНК- полимеразой. Для проведения амплификации необходимы следующие компоненты (рис. 3):

ДНК-матрица (анализируемый образец) – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК – мишени специфический продукт амплификации не образуется;

праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 п. н., идентичные соответствующим участкам ДНК – мишени. Они играют ключевую роль в обра-

зовании продуктов реакции амплификации и обеспечивают специфичность и чувствительность тест – системы. Праймеры комплементарны участкам ДНК, между которыми находится последовательность-мишень. Праймер является обязательным компонентом, необходимым для работы ДНК-полимеразы. Праймер к 5'-концу гена называют прямым (*forward, For*), к 3'-концу гена – обратным или встречным (*reverse, Rev*). В базах данных нуклеотидных последовательностей приведена только одна цепь ДНК – значащая, та, что транскрибируется в виде мРНК. По ней подбирают прямой праймер, т.е. тот праймер, от которого будет расти именно эта цепь. Обратный праймер подбирают для комплементарной цепи, но также в направлении 5'→3'.

смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дИТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый *Taq* – полимеразой для синтеза второй цепи ДНК;

фермент *Taq*-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

буферный раствор (смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальное условие для реакции, а также стабильное значение pH (реакционная среда), содержит ионы Mg^{2+} для поддержания активности фермента.

Для определения специфических участков генома РНК-содержащих вирусов, сначала получают ДНК-копию с РНК-матрицы, используя реакцию обратной транскрипции (RT), катализируемую ферментом ревертазой (обратной транскриптазой).

Для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20-40) циклов.

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах

1 этап - денатурация ДНК (расплетение двойной спирали). Протекает при 93-95°C в течение 30-40 сек.

2 этап - присоединение праймеров (отжиг). Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-65°C. Время отжига - 20-60 сек.

3 этап - достраивание цепей ДНК. Комплементарное достраивание цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материа-

лом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется ферментом термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72°C. Время протекания синтеза - 20-40 сек.

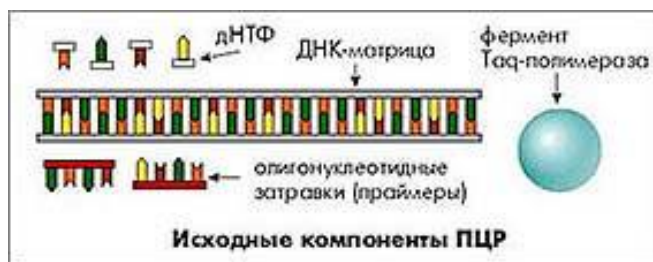


Рис. 4. Компоненты смеси для проведения амплификации.

Денатурация. На первом этапе необходимо расплести двойную цепь ДНК, находящуюся в образце (рис. 4). Температура и время денатурации выбираются как компромисс между двумя целями:

- "хорошо" денатурировать матрицу,
- не сильно повредить матрицу и Taq полимеразу.

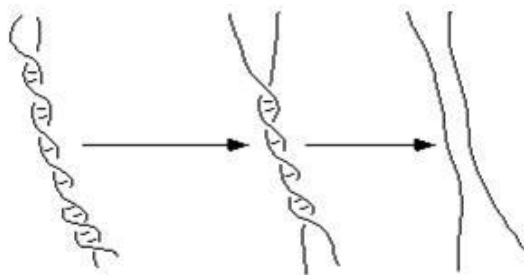


Рис. 5. Процесс денатурации двойной спирали.

Время денатурации сильно зависит от типа используемых пробирок. Для тонкостенных 0,2 ml пробирок достаточно 10-15 секунд при температуре 94 °C.

Отжиг праймеров. На втором этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Этот процесс носит название «отжиг» (от

англ. «annealing»). Оптимальная температура и время отжига праймеров обеспечивают эффективную ПЦР.



Рис. 6. Принцип комплементарности и антипараллельности цепей ДНК.

Если температура отжига праймеров будет занижена, то это может привести к неспецифической амплификации, а если завышена, то - к снижению выхода ПЦР-продукта. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Это означает, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина – цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит (рис. 5).

Определения температуры отжига. В общем случае более высокая температура отжига обуславливает более высокую специфичность. Но как только температура отжига превышает некую критическую (для данной пары праймеров), количество продукта начинает резко снижаться.

Температура оптимального отжига праймеров зависит от:

- полимеразы;
- состава праймера (отношение CG к AT);
- последовательности праймера (nearest-neighbor взаимодействия);
- концентрации Na^+ ;
- концентрации праймера;
- концентрации Mg^{2+} ;
- присутствия денатурирующих веществ, таких как формамид, DMSO;
- последовательности между праймерами;
- pH;
- ионной силы;
- концентрации ДНК;

- наличие других праймеров;
- наличие ингибиторов ПЦР;

Так как вышеперечисленные факторы учесть проблематично, то температуру отжига праймеров определяют эмпирически. При этом в качестве ориентира используют температуру плавления праймера. При использовании Tag-полимеразы рекомендуют использовать температуру отжига праймеров, рассчитанную согласно формуле:

$$T_{\text{отжига}} = T_{\text{плавления}} - 5^{\circ}\text{C}$$

Фирма GENOSYS рекомендует использовать температуру отжига на $5-10^{\circ}\text{C}$ ниже температуры плавления. Для Phusion™ Polymerase рекомендуется использовать температуру отжига на 3°C больше температуры плавления при длине праймера более 20 п.н. Это объясняется тем, что Phusion™ Polymerase обладает способностью стабилизировать комплекс праймер-ДНК.

Температура плавления – это температура, при которой половина нуклеиновых кислот находится в одноцепочечном состоянии, а вторая половина - в двухцепочечном.

2.5. Классификация и подбор праймеров

Классификация праймеров определяется типом полимеразной цепной реакции. Полимеразная цепная реакция разделяется на два основных типа: направленная ПЦР и ПЦР с использованием произвольных единичных праймеров.

Первый тип ПЦР (направленная) использует пару специфических праймеров и требует в качестве необходимого условия знание нуклеотидной последовательности фланкирующих участков амплифицируемых фрагментов ДНК для подбора к ним соответствующих праймеров. Размер праймеров для направленной амплификации обычно составляет 18-22 нуклеотида; ГЦ-состав должен быть выше 50%; 3'-конец праймера должен содержать следующие пары нуклеотидов: ЦЦ, ГГ, ЦГ, ГЦ. Праймеры с учетом всех этих условий могут образовывать и неспецифический продукт. В таких случаях необходимо повторить подбор праймеров, сдвинув участки поиска влево или вправо от мишени. Концентрация праймеров на реакцию составляет 10-50 нМ, а концентрация ионов Mg 1,5 мМ. Температура отжига праймеров $55-68^{\circ}\text{C}$.

Наиболее интересным является вариант направленной ПЦР – амплификации микросателлитных локусов (SSR). Подбор праймеров к интересующим участкам ДНК ведет на основе созданных в мире геномных библиотек. Концентрация праймеров на реакцию такая же, как в обычной направленной ПЦР, а концентрация ионов Mg составляет 1,5-3 мМ, что увеличивает точность отжига.

Следующий тип ПЦР – амплификация с единичными произвольными праймерами – имеет в настоящий момент несколько наиболее распространенных вариантов. Все эти методы не требуют предварительного знания нуклеотидной последовательности праймеров.

Вильямс и др. описали один из таких методов и назвали его RAPD. Для данной амплификации используются, как правило, 10 – мерные олигонуклеотиды. Показано, что замена нуклеотидов на 3' - конце праймера дает полное изменение рисунка полос амплифицированной ДНК по сравнению с результатами амплификации с исходным праймером и часто обнаруживает новые полиморфные продукты. Кроме того, установлено, что для успешной амплификации требуется, чтобы сайт отжига был совершенно гомологичен 5-6 нуклеотидам с 3' - конца праймера. Температура отжига выше 40°C в большинстве случаев препятствует амплификации. Реакция идет с использованием невысоких концентраций Mg – 2Мм и олигонуклеотидов.

Основные принципы подбора праймеров:

1. Праймеры должны быть специфичны. Если их специфичность недостаточно, то, вероятно, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, а именно синтез неспецифичной ДНК. Часть праймеров расходуется на синтез неспецифичной ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности.

2. Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т. е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом.

3. Область отжига праймеров должны находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров, специфичности.

2.6. Способы постановки ПЦР

«Горячий старт»

Чтобы уменьшить риск образования неспецифических продуктов реакции амплификации, используют подход, получивший название «горячий старт» (от англ. «hot-start»). Суть его состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

Дело в том, что в зависимости от ГЦ-состава и размера, праймеры имеют определенную температуру плавления (Tm), при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает Tm, праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и дена-

турирует. При соблюдении оптимальных условий, т.е. температуры отжига близкой к температуре плавления, праймер образует двухцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и, таким образом, обеспечивает специфичность реакции.

Варианты реализации «горячего старта»:

1. внесение в реакционную смесь Таq-полимеразы во время первого цикла после прогрева пробирки до температуры денатурации;

2. разделение ингредиентов реакционной смеси прослойкой, например, парафина или воска на части (в нижней - праймеры, в верхней - Таq-полимераза и ДНК-мишени), которые смешиваются при достижении температуры плавления материала прослойки (~45-85°C);

3. использование моноклональных антител к Таq-полимеразе. Фермент, связанный моноклональными антителами, становится активным лишь после стадии первой денатурации, когда моноклональные антитела необратимо денатурируют, и освобождают активные центры Таq-полимеразы.

Во всех перечисленных случаях, даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

«Nested» ПЦР

Одним из способов повысить чувствительность реакции является применение метода «nested» (гнездной) амплификации. Суть его заключается в последовательном использовании двух пар праймеров – внешней и внутренней. После использования первой пары праймеров продукт амплификации переносят в другую пробирку с внутренней парой праймеров. Иногда вместо «nested» амплификации используют процесс реамплификации. В этом случае проводят дополнительный раунд амплификации, в котором используют прежнюю пару праймеров, а в качестве ДНК-мишени – продукт первой реакции амплификации.

Такая схема постановки амплификации более трудоемка, поскольку, как правило, делает необходимым постановку двух реакций амплификации вместо одной и требует особенно тщательного обустройства лабораторных помещений, позволяющих гарантированно избегать контаминации продуктами реакции после использования внешней пары праймеров. К «гнездной» амплификации или реамплификации прибегают лишь в особых случаях, так как современные ПЦР-наборы позволяют добиваться тех же результатов иными средствами.

Полуколичественный анализ

Для более точной оценки количества ДНК-мишени в реакционной смеси предпринимаются специальные подходы, известные под общим названием полуколичественного ПЦР-анализа. Приставка «полу» имеет принципиальное значение из-за условной точности результатов этого анализа.

К таким подходам следует отнести использование специального приборного обеспечения в сочетании с препаратами специфической ДНК с известной концентрацией.

К приборному обеспечению, позволяющему получать полуколичественные результаты ПЦР анализа, следует отнести модели «iCycler IQtm» (Био-Рад, США) и «COBAS Amplicor» (Roche, США), которые позволяют следить за кинетикой накопления продуктов амплификации. Это достигается красивым решением на стыке физики и биологии. В реакционную смесь вводят гибридизационные зонды, в состав которых входят нуклеотиды, меченные особыми реактивами – флуорофором и тушителем. Флуорофоры способны излучать энергию лишь в свободном от тушителя состоянии. На стадии отжига происходит гибридизация зондов с внутренними участками ампликонов. В процессе элонгации Taq- полимеразы разрушает зонды за счет своей экзонуклеазной активности. Это приводит к попаданию меченых нуклеотидов в раствор, где они начинают флуоресцировать (рис. 6).

Интенсивность флуоресценции фиксируется специальным детектором и пропорциональна количеству продуктов амплификации. Если гибридизация не проходит, то зонд остается целым, а флуорофоры, входящие в его состав, не дают излучения

При исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами, в которых заведомо известно количество копий ДНК. Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в реакционных смесях в экспериментальном и контрольных образцах позволяет полуколичественно оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК.

Более простым, но менее надежным вариантом оценки количества специфической ДНК является метод разведений. Детекцию проводят после гибридизации с ДНК-зондами, или методом электрофореза, определяя количество работающих разведений.

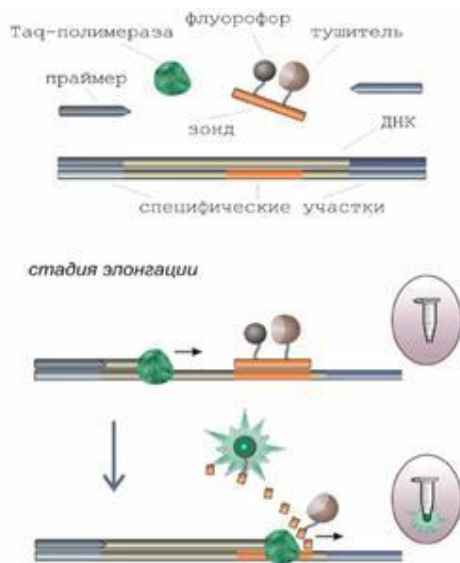


Рис. 7. Использование флуоресцентных зондов в процессе амплификации.

При всей привлекательности полуколичественного анализа следует отметить, что для его выполнения допускается использование только препаратов ДНК с высокой степенью очистки. Важно отметить, что существуют примеси, которые могут по-разному влиять на эффективность амплификации исследуемой и контрольной ДНК. При использовании упрощенных методов выделения ДНК в большинстве случаев не представляется возможным заранее предсказать количество и состав примесей в клинических образцах.

Известно, что в некоторых случаях возможны потери ДНК на стадии выделения, что может существенно исказить значение реального количества ДНК в образце.

Кроме того, точное знание количества возбудителей в конкретном клиническом образце далеко не всегда может дать полное представление об инфекционном процессе, например, из-за различной локализации и вирулентности микроорганизмов, а также состояния иммунной системы организма хозяина.

Таким образом, существующие варианты полуколичественного анализа пока еще не имеют большой практической ценности для рутинного клинического тестирования. В то же время их польза неоспорима при оценке эффективности терапии при некоторых инфекционных заболеваниях.

2.7. Контроль за прохождением реакции амплификации

Результат ПЦР можно квалифицировать как положительный или отрицательный в зависимости от того, обнаружена в образце интересующая нас последовательность-мишень или нет. Однако нарушение нормального хода амплификации, недостаточная чувствительность метода и непредвиденный полиморфизм последовательности-мишени в области связывания праймеров или гибридизационного зонда может дать ложноотрицательный результат. В случае загрязнения образцов и случайной гомологии между зондом, праймерами и последовательностью, сходной с мишенью, получаются ложноположительные результаты. Проблемы, которые возникают в связи с перекрестными реакциями с участием зонда или праймеров и возможным полиморфизмом.

Очень важным для правильной интерпретации результатов является выбор контролей. Положительные и отрицательные контроли должны быть хорошо охарактеризованы. Часто используют ДНК из клеточных линий, заведомо содержащих или не содержащих последовательность-мишень. В каждом анализе нужны как минимум три контроля:

- положительный контроль;
- отрицательный контроль;
- бланк-контроль.

Бланк-контроль - это реакционная смесь, в которой присутствуют все компоненты, за исключением ДНК; он является индикатором загрязнений. Один тип положительного контроля должен содержать максимальное число последовательностей-мишеней, другой — небольшое их число. Это позволяет определить чувствительность и эффективность ПЦР.

При подготовке пробы к постановке ПЦР используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации. Иногда бывает достаточно прокипятить образец в течение 5-10 минут, однако в большинстве случаев требуются более трудоемкие методы.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, предложенная Marmur. Она включает в себя ферментативный протеолиз клеток с последующей депротеинизацией и переосаждением ДНК спиртом. Однако это метод довольно трудоемок и предполагает работу с такими агрессивными и имеющими резкий запах веществами, как фенол и хлороформ.

Одним из популярных в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный Voorn с соавторами. Этот метод основан на исполь-

зовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента - гуанидина тиоционата (GuSCN) и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР. Поэтому при использовании этого метода очень важен правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологических нюансов. Следует отметить, что из-за большого количества стадий добавления и удаления растворов при работе с образцом требуется аккуратность, т.к. возможна перекрестная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК.

Другая группа методов пробоподготовки основана на использовании ионообменников типа Chlex, которые, в отличие от стекла, сорбируют не ДНК, а, наоборот, примеси, мешающие реакции. Как правило, эта технология включает две стадии: кипячение образца, в результате чего клеточные стенки разрушаются, а нуклеиновые кислоты выходят в раствор; и сорбция примесей на ионообменнике. Метод чрезвычайно привлекателен простотой исполнения. В большинстве случаев он пригоден для работы с клиническим материалом. К сожалению, иногда встречаются образцы с такими примесями, которые невозможно удалить с помощью ионообменников. Кроме того, клеточные стенки некоторых микроорганизмов не поддаются разрушению простым кипячением. В этих случаях необходимо введение дополнительных стадий обработки образца.

Для правильной оценки результатов ПЦР важно понимать, что данный метод не является количественным. Теоретически продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены с помощью электрофореза уже после 30-35 циклов. Однако на практике это выполняется лишь в случаях, когда реакция проходит в условиях, близких к идеальным, что в жизни встречается не часто. Особенно большое влияние на эффективность амплификации оказывает степень чистоты препарата ДНК, т.е. наличие в реакционной смеси тех или иных ингибиторов, от которых избавиться в некоторых случаях бывает крайне сложно. Иногда из-за их присутствия не удастся амплифицировать даже десятки тысяч молекул ДНК-мишени. Таким образом, прямая связь между исходным количеством ДНК-мишени и конечным количеством продуктов амплификации часто отсутствует.

2.8. Визуализация результатов амплификации

Для правильной оценки результатов ПЦР важно понимать, что данный метод не является количественным. Теоретически продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены с помощью электрофореза уже после 30-35 циклов (рис. 7).

Однако на практике это выполняется лишь в случаях, когда реакция проходит в идеальных условиях, что случается очень редко. Особенно большое влияние на эффективность амплификации оказывает степень чистоты препарата ДНК, т.е. наличие в реакционной смеси тех или иных ингибиторов, от которых избавиться в некоторых случаях бывает крайне сложно. Иногда из-за их присутствия не удастся амплифицировать даже десятки тысяч молекул ДНК-мишени. Таким образом, прямая связь между исходным количеством ДНК-мишени и конечным количеством продуктов амплификации часто отсутствует.

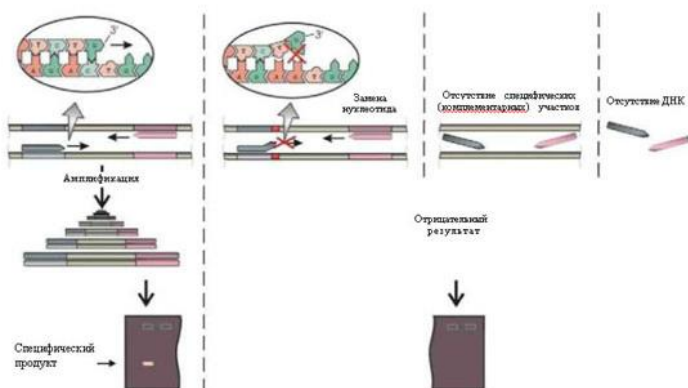


Рис. 8. Специфичность ПЦР.

Метод горизонтального электрофореза

Для визуализации результатов амплификации используют различные методы. Наиболее распространенным на сегодняшний день является метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Для этого готовят пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например, бромистого этидия. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенки в геле формируют специальные лунки, в которые в дальнейшем вносят продукты амплификации.

Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гелеэлектрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияет концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254, 310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).



Рис. 9. Электрофоретическая камера фирмы ООО «Хеликон» (Россия).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной. Поэтому часто в ПЦР-лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех- или пятибалльной системе. Однако, как уже отмечалось ранее, это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце. Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

Метод вертикального электрофореза

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с горизонтальным электрофорезом. Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используют полиакриламид. Его проводят в специальной камере для вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы

ДНК разных размеров с точностью до одного нуклеотида. Приготовление полиакриламидного геля несколько сложнее агарозного. Кроме того, акриламид является токсичным веществом. Поскольку необходимость определить размер продукта амплификации с точностью до 1 нуклеотида возникает редко, то в рутинной работе этот метод не используют.

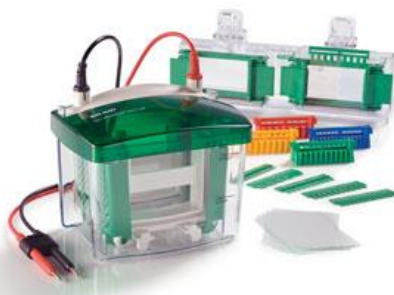


Рис. 10. Камера для вертикального электрофореза.

Метод гибридизационных зондов

Другой способ детекции продуктов амплификации основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов (искусственно синтезированных участков ДНК) с продуктами амплификации, содержащими ту или иную метку, детектируемую специальными

приборами. В этом случае чаще всего используют плащечный формат и систему детекции, аналогичную используемой в ИФА. Гибридизационные методы не получили пока широкого распространения из-за их дороговизны, длительности и трудоемкости методических манипуляций. Однако они интересны с точки зрения массового скрининга, т.к. при наличии соответствующего оборудования могут быть легко автоматизированы.

С момента открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. Метод ПЦР приобрел такую популярность, что сегодня уже трудно представить работу в области молекулярной биологии без его использования (рис. 8). Преимуществами ДНК-маркеров, перед остальными группами методов, являются ранняя диагностика болезней, точность определения и быстрота выполнения анализов

В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода.

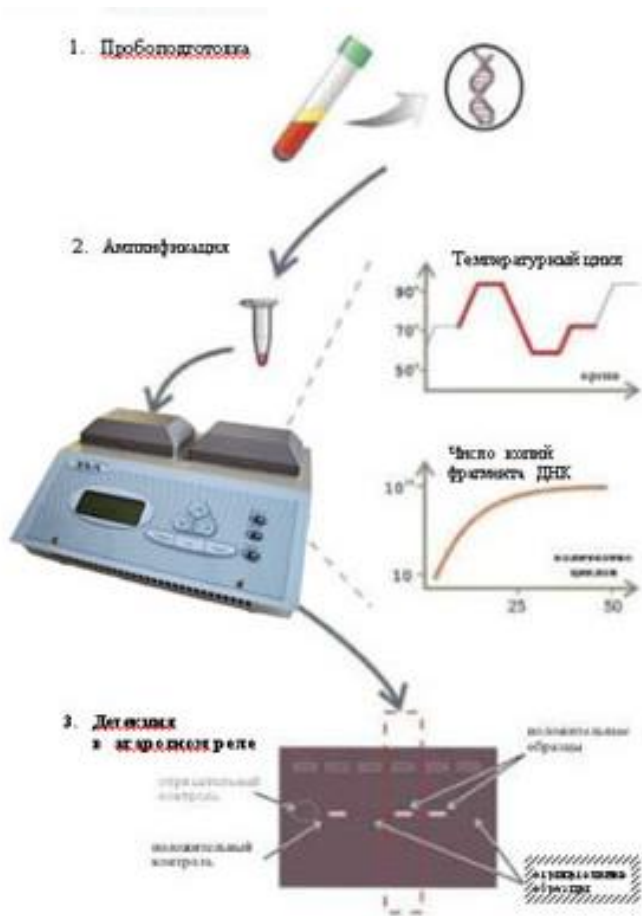


Рис. 8. Стадии прохождения ПЦР.

2.9. Проблема контаминации

Потенциально высокая чувствительность полимеразной цепной реакции делает совершенно необходимым особенно тщательное устройство ПЦР-лаборатории. Это связано с наиболее острой проблемой метода – контаминацией.

Контаминация – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул ДНК, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Таковыми мишенями могут быть продукты реакции, попадающие во внешнюю среду на этапе детекции из пробирок, в которых успешно прошла амплификация, либо специфическая ДНК из образцов на этапе пробоподготовки.

Существует несколько способов борьбы с этим неприятным явлением. Одним из них является использование фермента N-урацил-гликозилазы (УГ). В основе этого метода лежит способность УГ расщеплять молекулы ДНК со встроенным урацилом. Реакцию амплификации проводят с использованием смеси дНТФ, в которой дТТФ заменен на дУТФ (урацил), и после термоциклирования все образующиеся в пробирке ампликоны будут содержать урацил. Если до амплификации в реакционную смесь добавить УГ, то попавшие в реакционную смесь ампликоны будут разрушены, тогда как нативная ДНК останется целой и будет в дальнейшем служить мишенью для амплификации.

Другим способом инактивации ампликонов служит фотохимическое воздействие на молекулы ДНК. Для этого используют псорален или изопсорален, которые активируются кратковременным облучением ультрафиолетовым светом. Модифицированные этими соединениями молекулы ДНК не могут участвовать в реакции амплификации.

Однако, как известно, ни одна биологическая или химическая реакция не идёт со 100% эффективностью и, соответственно, после инактивации продуктов амплификации из миллиардов копий амплифицированного фрагмента хотя бы несколько останутся целыми, что существенно снижает ценность такого подхода. Кроме того, всегда остается риск кросс-контаминации от образца к образцу в процессе пробоподготовки. Для уверенности в отсутствии контаминации необходимо каждую серию экспериментов сопровождать отрицательными контролями. В качестве отрицательных контролей рекомендуется использовать воду из комнаты пробоподготовки). Все реактивы рекомендуется хранить разлитыми на отдельные порции (аликвоты).

Таким образом, современные технологии диагностики и идентификации фитопатогенов базируются, в основном, на методах ПЦР, которые постоянно совершенствуются в плане чувствительности, надежности и простоты применения. Диагностика фитопатогенов, приобретает черты динамичной и постоянно эволюционирующей системы.

3. Лабораторные занятия

3.1. Лабораторная работа «Выделение ДНК из растительных тканей»

При выделении ДНК из тканей растений весьма важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок. Кроме того следует учитывать, что растительные экстракты содержат большие количества белков, полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от ДНК. Ткани растений обычно разрушают механическим растиранием в присутствии детергентов, растворяющих мембраны клеток, и хелатирующих агентов, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счёт связывания двухвалентных катионов. От белков избавляются фенольной депротеинизацией образца. Иногда для освобождения ДНК от белков хроматина предусматривают использование протеиназ. Высокомолекулярная ДНК, очищенная от белков фенолом, осажденная спиртом и растворенная в соответствующих буферах пригодна для ПЦР.

Материал и оборудование: растения пшеницы (или замороженные ткани), микроцентрифуга, морозильник, вортекс, ступки с пестиками, прокаленный кварцевый песок, пробирки типа «Эппендорф», стаканчики различного объема, автоматические пипетки с наконечниками.

Приготовление реактивов:

- *Буфер для экстракции:* 100мМ Tris-HCl, pH 8,0; 50мМ ЭДТА; 500мМ NaCl; 1,25% SDS; 8,3мМ NaOH; 0,83% Na₂S₂O₃.

- *Буфер TE:* 10мМ Tris-HCl, pH 8,0; 1мМ ЭДТА.

- 3М ацетат калия, pH 5,0.

- SDS - 5% -ный раствор додецилсульфата натрия в буфере TE.

- 5М NaCl. Растворить 29,25 г NaCl в 80,0 мл воды и довести объём до 100,0 мл.

- Смесь фенол-хлороформ: водонасыщенный фенол (насыщенный 0,1М Tris-HCl, pH 8,0) смешивают в пропорции 1:1 с заранее приготовленной смесью хлороформ-изоамиловый спирт.

-Смесь хлороформ-изоамиловый спирт в пропорции 24:1 по объёму.

Ход работы. Приготовить навеску 200 мг листьев растений, быстро заморозить навеску в жидком азоте (можно предварительно заморозить образцы при -20 С в морозильнике). Образцы растереть в предварительно охлажденной фарфоровой ступке до гомогенного состояния. Если нет жидкого азота, то при растирании к замороженным листьям необходимо добавить 0,1 г прокаленного речного песка и 300 мкл буфера для экстракции ДНК. Добавить в ступку 700 мкл буфера для экстракции, снова перемешать. Перенести растертую массу в микропробирку типа «Эппендорф» на 2мл. Перемешать и инкубировать гомогенат при 65 С в течение 10 минут на водяной бане. Добавить 220 мкл ацетата калия и поместить про-

бирку в холодильник на 20 минут. Центрифугировать пробу в течение 3 минут при скорости 10000 об/мин. Перенести супернатант (надосадочную жидкость) в чистую пробирку. К супернатанту добавить равный объем изопропанола, перемешать и центрифугировать 10 минут при 10000 об/мин для осаждения ДНК. Осадок ДНК промыть 70% этанолом, растворить в 200 мкл буфера TE. Для фенольной депротеинизации пробирку с раствором ДНК прилить равный объем фенол–хлороформной смеси, хорошо перемешать на вортексе и центрифугировать. Отобрать водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку, не захватывая интерфазу. Повторить то же самое, используя смесь хлороформ–изоамиловый спирт. Отобрать водную фазу с ДНК в чистую пробирку, прилить к образцу 1/10 объема 3М ацетата калия (рН 5,0), далее для осаждения ДНК прилить 2,5 объема холодного 96% этанола. Пробу центрифугировать в течение 10 мин при скорости 12000 об/мин. Супернатант слить. Осадок промыть 70% спиртом. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 50 мкл буфера TE. В буфере TE можно хранить ДНК в холодильнике при +4С несколько месяцев.

3.2. Лабораторная работа «Выделение ДНК из мицелия чистых культур грибов»

За последние десятилетие для большинства патогенов – возбудителей болезней основных продовольственных культур расшифрованы некоторые фрагменты ДНК их генома. Данная информация представлена для открытого доступа на Интернет-сайте Генного Банка и ежедневно пополняется. Имеющиеся нуклеотидные последовательности позволяют разработать ДНК-зонды для выявления практически любого вида.

Материал и оборудование: мицелий грибов рода *Septoria*, микроцентрифуга, морозильник, встряхиватель, сушильный шкаф, вортекс, ступки с пестиками, прокаленный кварцевый песок, пробирки типа «Еппендорф», стаканчики различного объема, автоматические пипетки с накопечниками, стеклянные палочки, 200 мМ р-р Трис; 250 мМ р-р хлорида натрия; 25 мМ р-р трилона Б; 0,5% лаурилсульфат натрия, HCl.

Приготовление реактивов:

Экстрагирующий буфер: 200 мМ р-р трис; 250 мМ р-р хлорида натрия; 25 мМ р-р трилона Б; 0,5% лаурилсульфата натрия, (рН буфера довести HCl до значения 8,1).

Ход работы: Навеску мицелия массой 25 мг 5-7-дневной культуры *Septoria nodorum* мг поместить в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 400 мкл экстрагирующего буфера следующего состава. Далее, используя прокаленные стеклянные палочки, производили гомогенизацию материала. По окончании гомогенизации пробирку с растертым образцом закры-

вать, перемешать на встряхивателе 30-40 сек и инкубировать гомогенат при 65 С в течение 15 минут на водяной бане.

После экстракции в пробирку добавить 350 мкл охлажденного 5М ацетата натрия (рН 5,0) и инкубировать на ледяной бане ($T = 0^{\circ}\text{C}$) в течение 60 мин. После инкубации гомогенаты центрифугировать при 10000g ($T = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 20 мин. По окончании центрифугирования пипеткой отбирать 650 мкл супернатанта, перенести в другую центрифужную пробирку (объемом 1,5 мл) и смешать с 650 мкл хлороформа и центрифугировали при 10000g ($T = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 20 мин.

По окончании центрифугирования пипеткой отобрать 500 мкл супернатанта, переносили в другую центрифужную пробирку на 1,5 мл и добавить 500 мкл изопропанола. Содержимое пробирки перемешать на встряхивателе 5 мин. Далее центрифугировать при 10000g ($T = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 15 мин.

Супернатант слить, а полученный осадок ДНК промыть 1000 мкл 65% этанола, охлажденного до температуры -10°C . После промывания пробирки центрифугировать при 10000g ($T = 4^{\circ}\text{C}$) в течение 15 мин. Процедуру промывки провести 2-3 раза для удаления из осадка остатков трилона Б, ацетата натрия и изопропанола.

После промывки этанолом пробирки поместить в штативе горизонтально и, открыв крышки, просушить осадок ДНК в течение 30-40 мин. ($T = 45^{\circ}\text{C}$) до полного испарения этанола. Высушенный осадок растворить в 100 мкл бидистиллированной и деионизированной Растворенную ДНК можно хранить при 4°C несколько недель.

3.3. Лабораторная работа «Выделение ДНК из пораженных растений»

Материал и оборудование: образцы растений (листья, корни, стебли) с признаками поражения, микроцентрифуга, морозильник, вортекс, ступки с пестиками, пророкаленный кварцевый песок, пробирки типа «Еппендорф», стаканчики различного объема, автоматические пипетки с наконечниками.

Буфер для экстракции (СТАВ): 2% р-р бромида цетилтриметиламмония; 0,1М р-р трис; 1,4М р-р хлорида натрия; 20 мМ р-р тритона Б (рН буфера довести НС1 до значения 8,0).

Ход работы: Кусочки растений с признаками поражения (50 мг) поместить в центрифужную пробирку типа “Eppendorf” объемом 1,5 мл, содержащую 500 мкл экстрагирующего буфера ($T=65^{\circ}\text{C}$). Далее, используя прокаленные стеклянные пестики, производили гомогенизацию материала при комнатной температуре в течение 30-40 с. По окончании гомогенизации пробирку с растертыми тканями закрывать и перемешать со-

держимое на встряхивателе. После этого пробирки поместить на водяную баню и инкубировать в течение 30 мин. при 65 °С.

После экстракции пробирку охладить до комнатной температуры, и к образцу добавить 500 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1). Содержимое перемешивать на вортексе (200 мин⁻¹) в течение 20 мин. при комнатной температуре. Далее центрифугировать при 13000g в течение 10 мин. После этого пипеткой отобрать 500 мкл супернатанта, перенести в другую пробирку “Eppendorf” объемом 1,5 мл, добавить 100 мкл буфера 5xСТАВ (5% р-р СТАВ; 350 мМ р-р тритона Б). Содержимое перемешать на вихревом смесителе и инкубировать на водяной бане в течение 10 мин. при 65 °С. После инкубации добавляли 500 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1). Содержимое перемешать на вортексе в течение 10 мин. при комнатной температуре, после чего центрифугировать при 5000g (T = 18-20 °С) в течение 10 мин. (если раствор был мутный, то процедуру очистки хлороформом и изоамиловым спиртом нужно повторить).

После центрифугирования пипеткой отобрать 300 мкл супернатанта и переносили в другую центрифужную пробирку типа “Eppendorf” объемом 1,5 мл, после чего добавляли ТИ, (рН буфера довести HCl до значения 8,0). Содержимое перемешивали на вихревом смесителе (400 мин⁻¹) и оставляли на 60 мин. при комнатной температуре. Далее производили центрифугирование при 13000g (T = 18-20 °С) в течение 20 мин.

Супернатант сливали, а полученный осадок ДНК растворяли в 400 мкл буфера следующего состава: 1М р-р хлорида натрия; 10мМ р-р трис; 1мМ р-р трилона Б, (рН буфера довести HCl до значения 8,0). Далее добавляли 500 мкл охлажденного изопропанола и оставляли на 30 мин. После промывки содержимое пробирки центрифугировали при 8000g (T = 4 °С) в течение 10 мин. Супернатант сливали, а полученный осадок ДНК растворяли в 200 мкл дистиллированной воды, затем к раствору приливали 100 мкл 7,5М ацетата аммония (рН 7,5). Пробирки инкубировали на ледяной бане (T = 0 С) в течение 20 мин., после чего центрифугировали при 13000g (T = 4 С) в течение 10 мин. Далее к отобранному супернатанту добавляли 300 мкл охлажденного изопропанола и оставляли на 20 мин., после чего центрифугировали при 13000g (T = 4 °С) в течение 10 мин. Полученный осадок ДНК промывали 1000 мкл 65% этанола, охлажденным до температуры -10 °С. После промывания содержимое пробирки центрифугировали при 15000g (T = 4 °С) в течение 10 мин. После промывки этанолом пробирки размещали в штативе и, открыв крышки, просушивали осадок ДНК в течение 30-40 мин (T = 45 °С) до полного испарения этанола.

Высушенный осадок растворяли в 100 мкл бидистиллированной и деионизированной воды во встряхивающей ванне (200 мин⁻¹) при 40 °С в

течение 30 мин. Растворенную ДНК хранили при 4 °С для последующего анализа.

3.4. Лабораторная работа «Выделение РНК с помощью гуанидинтиоцианата и тризола»

Материал и оборудование: растения пшеницы, микроцентрифуга, морозильник, встряхиватель типа 358S (Erap, Польша), вортекс, ступки с пестиками, пробирки типа «Еппендорф», стаканчики различного объема, автоматические пипетки с наконечниками буфер гуанидинтиоцианат, 3М СН COONa (рН 5,0), дистиллированная вода, обработанная DEPS, 10% додецилсульфат натрия (SDS), фенол, хлороформ, изопропанол, 8М LiCl, тризол, вода высокой очистки (mQ).

Выделение РНК с помощью гуанидинтиоцианата. Этот метод дает хорошие результаты при работе с образцами, содержащими большие количества РНКаз, и является наиболее распространенным методом выделения РНК. Гуанидинтиоцианат – очень сильный денатурирующий агент, который используется для одновременного лизиса клеток и денатурации всех клеточных белков (в том числе РНКаз). Поскольку плавучая плотность РНК в два раза выше, чем у ДНК и белков, ее можно отделить от других клеточных компонентов равновесным центрифугированием в градиенте плотности LiCl.

Ход работы: проростки растений (100 мг) растереть в жидком азоте до гомогенного состояния. К полученному объему добавить буфер гуанидинтиоцианат, 3М СН COONa и 10% SDS, тщательно гомогенизировать. Затем добавить равное количество водонасыщенного (рН 5,0) фенола и хлороформа, интенсивно перемешать на встряхивателе и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 минут при +4°С. Водную фазу перенести в чистую пробирку с равным объемом водонасыщенного фенола и хлороформа, вновь тщательно перемешивали и центрифугировали при тех же условиях. На последнем этапе выделения добавить изопропанол и оставляли при -20°С минимум на один час для формирования осадка РНК. Перед использованием РНК осадить центрифугированием, промыть 70% этанолом и растворить в минимальном количестве дистиллированной воды, обработанной DEPS. Для более тщательной очистки от примесей ДНК осадок РНК осаждали 8М LiCl в течение ночи. Все процедуры с РНК проводили при 0 - +4°С

Выделение РНК с помощью тризола. Растереть растительный материал (100-120 мг) в жидком азоте до гомогенного состояния и перенести в пробирку. Добавить 1 мл тризола. Центрифугировать при 12000 g 10 мин при 4°С. Отобрать надосадочную жидкость в новую пробирку. Добавляем 0,5 мл водонасыщенного фенола и хлороформа. Инкубируем 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Центрифугу-

гируем при 12000 об/мин при 4°C. Смесь разделяется на три фазы: прозрачная верхняя водная, содержит РНК, в виде белой пленки интерфаза, которая содержит белки, нижняя красная фенол-хлороформная. Отобрать верхнюю прозрачную фазу в новую пробирку. Добить равный объем хлороформа. Инкубировать 10 мин на столе, периодически, перемешивая. Центрифугировать при 12000 g 10 мин при 4°C. Повторять очистку РНК хлороформом до тех пор, пока полностью не исчезнет интерфаза. Перенести верхнюю фазу в новую пробирку. Добавить 1 мл изопропилового спирта для осаждения РНК. Инкубировать при -20°C минимум 1 ч (лучше оставить на ночь). Центрифугировать при 12000 g 10 мин при 4°C. РНК формирует гелеподобную гранулу в нижней части пробирки. Слить надосадочную жидкость и промыть осадок РНК 75% этиловым спиртом. Центрифугировать при 8000 g 5 мин при 4°C. Слить надосадочную жидкость и растворить осадок в небольшом количестве воды mQ (20-50 мкл). Хранить при -20°C не больше 2 недель.

3.5. Лабораторная работа «Аmplификация ДНК и визуализация продуктов ПЦР»

Материалы и оборудование: амплификатор ТП4-ПЦР-01-«Герцик», пробирки типа «Эппендорф», весы, микроволновая печь, электрофоретическая камера S2 фирмы ООО «Хеликон» (Россия), источник питания Эльф-8 фирмы ДНК-Технология (Россия), набор реактивов для ПЦР, ДНК грибов, праймеры (10 пМ/мкл), смесь нуклеотидов *dNTP-mix* (2мМ), раствор хлорида магния (25мМ), *Taq*-полимераза (5 ед/мкл), 10x ПЦР-буфер, ТАЕ-буфер, содержащий 40 мМ трис-ацетата (рН 7.6) 2 мМ ЭДТА.

Аmplификация специфических фрагментов ДНК. На данной стадии происходит накопление коротких специфических фрагментов ДНК в количестве, необходимом для их дальнейшей детекции. Процедуру проводят в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-«Герцик». Праймеры подбираются длиной 18-25 п.н. с температурой плавления 68-71°C таким образом, чтобы фланкируемая ими нуклеотидная последовательность составляла около 350-400 п.н. При использовании в ПЦР реакции внутреннего контроля (ВК), длина ампликона которого составляла 560 п.н., разница в длинах ампликонов специфического продукта и ВК обеспечивает их четкое разделение при проведении электрофоретического анализа. Видоспецифичность сконструированных праймеров предварительно проверяется с помощью программы BLAST, имеющейся на сайте National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Приготовить растворы:

1. ПЦР-буфер (200мМ Tris–HCl, pH 8,4; 500мМ KCl; 0,01% Tween 20) – 2 мкл;
2. 2 мМ dNTP mix (смесь из всех 4-х дезоксирибонуклеозидтрифосфатов с концентрацией по 2 мМ каждого) – 2 мкл;
3. 25мМ раствор MgCl₂ – 2 мкл;
4. Праймер ND2 For: 5'–GCATTTTCATGACCACCACC–3' – 2 мкл;
5. Праймер ND2 Rev: 5'–GAGTGAGGGGTAAGATAGTG–3' – 2 мкл;
6. ДНК-мишень: общая ДНК *Septoria nodorum* (40 нг/мкл) – 3 мкл;
7. Вода деионизованная – 6,8 мкл;
8. Таq-полимераза – 0,2 мкл.

Ход работы:

1. В стерильной пластиковой тонкостенной пробирке на 0,5 (0,2) мл смешать указанные выше компоненты, довести объём при помощи деионизованной воды до 20 мкл. Фермент (Таq-полимераза) добавлять последним.

2. Центрифугировать 15 с. Нанести поверх реакционной смеси немного минерального масла для предотвращения испарения (\approx 30 мкл пипеткой или каплей). Если ДНК-амплификатор имеет нагреваемую крышку, то масло добавлять не нужно. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор.

3. Запустить следующий режим ПЦР: предварительная денатурация матрицы при 95 С – 5 мин, затем 30 циклов амплификации: 95⁰ С – 30 с, 57⁰ С – 30 с, 72⁰ С – 1 мин, затем задать температуру 72⁰ С – 5 мин (окончательная достройка цепей) и вывести на +4 С – режим хранения. Расчётная температура отжига обоих праймеров составляет 60 С.

4. Провести электрофорез ДНК, сфотографировать гель.

Проведение электрофоретического анализа. На данном этапе проводится разделение смеси продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Анализ продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле. Электрофорез проводить в электрофоретической камере S2 фирмы ООО «Хеликон» (Россия). Источниками питания служит прибор Эльф-8. Продукты ПЦР разделять электрофорезом в 2,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (40 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 20 мМ ледяной уксусной кислоты и 1 мМ EDTA) при постоянном напряжении 10 В/см. При разделении фрагментов ДНК электрофорез проводить при напряжении 120 В в течение 1 часа – 1 часа 30 мин.

Для определения молекулярного веса амплифицированных фрагментов использовали ДНК маркер 100-1000 п.н. с шагом 100 п.н. GeneRuler («Fermentas», Литва).

Заливка агарозного геля: взвесить необходимое количество агарозы (2,5%), долить буфер до нужного объема, агарозу довести до кипения, кипятить 30-60" (вынимать из микроволновой печи осторожно - может резко вскипеть), остудить до 50-60°C (лучше с покачиванием); "пролить" спейсеры, дать агарозе застыть в течение 2-4', залить плашки, дать агарозе застыть в течение 0.5-1 ч (гребенку не вынимать).

Измерение концентрации ДНК/РНК. Предел измерения прибора $\sim 0.1 \mu\text{g/ml}$, т.е. на анализ требуется $\geq 0.01 \mu\text{g}$. Удобнее пользоваться "маленькой" (100 μl) ячейкой. Чтобы кривизна поверхности жидкости не влияла на измерения лучше брать объем образца равный 130 μl . На отношение A_{260}/A_{280} (1.8-1.9 - весьма чистая ДНК, 1.9-2.0 –РНК) имеет смысл обращать внимание только если измерение проводится в буферном растворе (например, TE) при нейтральном pH.

Измерение концентрации олигонуклеотидов. Молекулярный коэффициент экстинкции (ОД). OD - единица измерения количества олигонуклеотидов, соответствует количеству, которое в 1ml на пути 1cm дает $A_{260}=1$ (вес может находится в пределах 20-33 μg в зависимости от состава олигонуклеотида. Обычно он $\sim 33 \mu\text{g}$).

Визуализация продуктов электрофореза производится окрашиванием гелевых пластин в растворе бромистого этидия. Гелевая пластина помещается в раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и выдерживалась в красителе в течение 15 мин. Затем гель извлекался и промывался в дистиллированной воде для удаления остатков красителя. Для визуального наблюдения гель помещался в УФ-трансиллюминатор. Фотодокументирование продуктов электрофореза достигалось за счет видеосканирования в УФ-свете специальной системой Image Master (фирма "Amersham Pharmacia Biotech"). Расчет размеров выявляемых зон производится с помощью программного обеспечения Quantity One (фирма "Biorad"). Анализ размеров ампликонов, получаемых в ходе ПЦР-диагностики проводится с помощью программы Beacon Designer V.3.0., CLC Sequence Viewer 6., NEB Cutter 2.0.

Список литературы

1. Абрамова, С. Л. Диагностика фитопатогенных грибов *Septoria tritici* и *Stagonospora nodorum* методом FLASH-ПЦР / С. Л. Абрамова, Д. Ю. Рязанцев, Т. М. Воинова, С. К. Завриев // Биоорганическая химия. - 2008. - Т. 34. - № 1. - С. 107–113.
2. Абрамова, С. Л. Видовая идентификация изолятов из полевых образцов грибов рода *Fusarium* / С. Л. Абрамова, Д. Ю. Рязанцев, А. А. Стахеев, С.К. Завриев // Вестник РАСХН. - 2011. - № 2. - С. 56-57.
3. Абрамова, С. Л. Идентификация возбудителей ржавчины пшеницы методом полимеразной цепной реакции / С. Л. Абрамова, А. И. Жемчужина, Н. С. Жемчужина, Д. Ю. Рязанцев, С. К. Завриев // Вестник РАСХН. - 2011. - № 5. - С. 15-17.
3. Баранов, О.Ю. Молекулярно-генетическое маркирование патогенеза лесных древесных видов / О.Ю. Баранов, В.Е.Падутов, С.В. Пантелеев // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. Прилож. к журналу «Молодежь в науке – 2009». – 2010. – Ч. 4. – С. 10-12.
5. Билай, В.И. Микроорганизмы – возбудители болезней растений (справочник) / В.И. Билай [и др.]. – Киев: Наукова думка, 1988. – 550 с.
6. Дейвис К. Анализ генома. Методы // Москва « Мир» 1990 с 36.
7. Дьяков, Ю.Т. Общая и молекулярная фитопатология / Ю.Т. Дьяков. – М.: Общ-во фитопатологов, 2001. – 301 с.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М. Мир, 1984. 480 с.
9. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
10. Рязанцев, Д. Ю. Диагностика токсигенных грибов рода *Fusarium* методом FLASH-ПЦР / Д. Ю. Рязанцев, С. Л. Абрамова, С. В. Евстратова, Т. Ю. Гагкаева, С. К. Завриев // Биоорганическая химия. - 2008. - Т. 34. - № 6. С. 799–807.
11. Рязанцев, Д. Ю. ДНК-технологии для диагностики и идентификации токсигенных патогенов зерна и продуктов его переработки / Д. Ю.Рязанцев, С. Л. Абрамова, С. В. Евстратова, Т. Ю. Гагкаева, С. К. Завриев // Биотехнология. Вода и пищевые продукты: Материалы международной научно-практической конференции, 11-13 марта 2008 г., Москва. С. 364-365.
12. Семенкова, И.Г. Фитопатология: Учебник для студ. Вузов / И.Г. Семенкова, Э.С. Соколова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 480 с.
13. Сиволап Ю. М. Использование ПЦР – анализа в генетико – селекционных исследованиях // Киев, Аграрна Наука 1998 с 22, с 34, с 45.
14. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир, 1998. Т. 1– 2.

15. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White [et al.] // in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White eds.). – New York: Academic Press Inc. – 1990. – P. 315-322.

16. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes / P.W. Tooley [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63. – P. 1467–1475.

17. Chomezynski P., Sacchi N. Single – step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction // *Anal. biochem.* 1987. V. 162. P. 156 – 187.

18. Griffiths, R.I. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition / R.I. Griffiths [et al.] // *Appl. Environ. Microb.*, 2000. – V.66 – P. 5488-5491.

19. Zhou, Y. Synthetic molecular mimics of naturally occurring cycloartenones exhibit antifungal activity towards pathogenic fungi / Y. Zhou [et al.] // *Microbiology*, 2011. – 157. – P. 3435-3445.

20. <http://www.forestpests.org/nursery/phomabligh.html>

21. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/acetacid-etridiazole/captafol/>

22. <http://www.agrocn.com>.

23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>.

