

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ
ООО ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

ISSN 1815-3682

**ВЕСТНИК
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ**
Приложение

PLANT PROTECTION NEWS
Supplement

**ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ
И ВЫСОКОТОЧНЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ И МЕТОДЫ
ФИТОСАНИТАРНОГО МОНИТОРИНГА**

Санкт-Петербург - 2009

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА КУКУРУЗНОГО МОТЫЛЬКА *OSTRINIA NUBILALIS* HBN НА ОСНОВЕ ПЦР*

Общие сведения

Бакуловирусы (Baculoviridae) широко распространены в природе как возбудители ядерных полиэдрозов и гранулезов чешуекрылых насекомых. Их способность вызывать эпизоотии, а также длительно сохраняться в латентной форме в популяциях сельскохозяйственных и лесных вредителей обуславливает их практическое значение в защите растений (Тарасевич, 1975; Бахвалов, 2001). Диагностика бакуловирусных инфекций традиционными методами не всегда дает ясные результаты и не позволяет идентифицировать вид возбудителя вироза (световая микроскопия) либо требует применения сложных процедур и целого комплекса специального оборудования (электронная микроскопия). Кроме того, микроскопические методы не позволяют выявить инфекцию в латентной форме (когда геном вируса интегрирован в геном насекомого), определение которой возможно только косвенными методами за счет искусственной активации вироза (Бахвалов, 2001). С другой стороны, в современной вирусологии уже давно применяют подходы молекулярно-биологического анализа, методическая и материально-техническая база для которого с каждым годом становится все доступнее. Набор относительно несложных методик экстракции ДНК, амплификации специфических участков генома, электрофореза и визуализации ПЦР-продуктов позволяет быстро и эффективно анализировать большие выборки насекомых на зараженность вирусами как в активной, так и в латентной форме, а секвенирование амплифицированных продуктов позволяет проводить видовую идентификацию обнаруженных вирусов и определять их место в современной системе, построенной на анализе нуклеотидных последовательностей консервативных участков ряда генов.

Описание метода**

Гусениц кукурузного мотылька из природных популяций собирают, вскрывая заселенные стебли кукурузы (Фролов, 1994). Содержание гусениц в течение 1-2 недель в лабораторных условиях позволяет выявить случаи массовой гибели, характерные, в частности, для эпизоотии вирозов. Биологический материал может быть сохранен путем высушивания и/или лиофилизации трупиков, фиксации этанолом или замораживания насекомых.

Для экстракции ДНК образцы насекомых (или выделенных вирусных частиц) гомогенизируют стерилизованным тefлоновым или пластиковым пестиком в 100 μ л лизирующего буфера, содержащего 2% ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 100 мМ ЭДТА Na₂, 100 мМ Трис-Cl (pH 8.0). После гомогенизации к образцам добавляют по 500 μ л лизирующего буфера с добавлением 0.2% β -меркаптоэтанола и 10 μ л протеиназы К. Смесь инкубируют на водяной бане при 65°C в течение 3 часов. Далее проводят очистку и осаждение ДНК по следующей прописи (Sambrook et al., 1989):

1) к ДНК-содержащему лизирующему буферу добавляют равный объем (600 μ л) смеси забуференного Трисом (pH=6.8) фенола/хлороформа/изоамилового

* Токарев Ю.С., Дубровина А.Г., Мальш Ю.М., Митрофанов В.Б., Фролов А.Н. (Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН)

** Исследования поддержаны грантами РФФИ №№ 07-04-92170 и 09-04-00619.

спирта (25/24/1),

- 2) аккуратно перемешивают в течение 1 мин;
- 3) центрифугируют при 7000 g в течение 10 мин;
- 4) верхнюю фазу (450 μ л) переносят в новую пробирку;
- 5) добавляют равный объем охлажденного хлороформа/изоамилового спирта (24/1);
- 6) повторяют процедуры, указанные в пп. 2-5, используя 350 μ л верхней фазы;
- 7) повторяют процедуры, указанные в пп. 2-4, используя 300 μ л верхней фазы;
- 8) добавляют равный объем охлажденного изопропанола;
- 9) аккуратно перемешивают в течение 1 мин и помещают на 8-12 часов (а при необходимости – на несколько суток или недель) в морозильную камеру при -22°C . В случае, когда требуется более быстрое осаждение ДНК изопропанолом, пробирки со смесью помещают на -80°C на 1 час.

10) образцы размораживают и центрифугируют в заранее охлажденной центрифуге при 10000 g и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Если в образцах, вынутых из морозильной камеры, наблюдаются кристаллы замерзшей воды (не путать с белым осадком нуклеиновых кислот!), образцы размораживают и повторяют процедуры с п. 9.

11) аккуратно декантируют спирт и заливают образцы 96%-ным или 70%-ным этанолом, предварительно охлажденным при -22°C ;

12) центрифугируют при 10000 g и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин;

13) один или два раза повторяют процедуры по пп. 11 и 12, используя 70%-ный спирт;

14) декантировав спирт после последней отмывки, высушивают осадки ДНК при комнатной температуре в течение нескольких часов, ресуспендируют в 50 μ л сверхочищенной воды и хранят при -22°C .

Полученный маточный раствор матричной ДНК необходимо развести сверхочищенной водой как минимум в 10 раз для снижения концентрации потенциальных ингибиторов полимеразы и других компонентов, способных интерферировать с реагентами ПЦР. Снижение концентрации ДНК при этом не влияет на результаты анализа, так как чувствительность ПЦР позволяет диагностировать вирусную инфекцию по наличию ДНК, выделенной из одного вириона (de Moraes et al., 1999). Для амплификации гена полиэдрина *polh* или фактора поздней элонгации *lef-8* используют пары вырожденных праймеров, рекомендованных для первичного выявления новых форм бакуловирусов (табл. 1).

Амплификацию проводят в объеме 10 μ л, содержащем 5 μ л матричной ДНК, однократный ПЦР-буфер; смесь дНТФ, 0,25 мМ; Taq-полимеразу, 0,4 U μ л $^{-1}$; прямой и обратный праймер. Критическим моментом является концентрация праймеров. Поскольку используются вырожденные праймеры (смесь праймеров с различающимися последовательностями нуклеотидов, позволяющая амплифицировать последовательности ДНК вирусов различных видов), концентрация эффективного праймера в этой смеси (то есть того, который будет гибридизоваться с данной матрицей) значительно ниже. В связи с этим положительная реакция наблюдается при концентрации праймеров 1 и более пМол на ПЦР-пробу. Помимо анализируе-

мых образцов ДНК, выделенных из насекомых, обязательно включение в набор ПЦР-проб положительного (эталонный образец ДНК из коллекционного бакуловирусного препарата) и отрицательного (сверхочищенная вода без добавления ДНК) контролей.

Аmplификацию проводят в объеме 10 μ л, содержащем 5 μ л матричной ДНК, однократный ПЦР-буфер; смесь дНТФ, 0,25 мМ; Taq-полимеразу, 0,4 U μ л⁻¹; прямой и обратный праймер. Цикл ПЦР состоит из а) начальной денатурации при 94°C в течение 180 сек; б) 30 циклов денатурации при 94°C в течение 180 сек, гибридизации при 54°C в течение 30 сек и элонгации при 72°C; в) заключительной фазы при 72°C в течение 10 мин. При проведении установочных реакций элонгацию проводят в течение 120 сек (что соответствует времени, достаточному для синтеза фрагмента размером 2000 п.о.). После того, как определен примерный размер амплифицируемых фрагментов для анализируемых форм бакуловирусов, время элонгации может быть сокращено (из расчета 30 сек на 500 н.о.).

ПЦР-продукты разделяют в 1%-ном агарозном геле с добавлением 0,5 μ г мл⁻¹ бромистого этидия в горизонтальной камере для электрофореза. Гели просматривают и фотографируют на трансиллюминаторе. Подтверждением правильности диагноза служат

а) совпадение положительных результатов для одних и тех же образцов при ПЦР с различными наборами праймеров;

б) соответствие размеров ПЦР-продуктов в опытных вариантах таковому в положительном контроле;

в) отсутствие положительной реакции в отрицательном контроле.

Таблица 1. Праймеры, используемые для амплификации участков генома бакуловирусов

Праймер	5'-3' последовательность	Амплифицируемый участок	Ссылка
polhF	TAYGTGTAYGAYAACA ART	Ген полиэдри- на polh	de Moraes et al., 1999
polhR	TTGTARAAGTTYTCCCA RAT		
L8F2	gtaaacgacgagccagtNNNAC NRCNGARGAYCC	Ген фактора поздней элон- гации lef-8	Herniou et al., 2004
L8R2	aacagctatgaccatgMMNCC YTTYTGNC CRTG		

Расшифровка для полиморфных позиций: Y = Т или С; R = А или G; M = А или С; N = А G, С или Т. В нуклеотидной последовательности праймеров L8F2 и L8R2 маленькими буквами указаны участки, соответствующие праймерам M13 -20 Universal и M13revers, позволяющие проводить прямое секвенирование амплификатов с этими праймерами.

При необходимости дальнейшего анализа участки геля, содержащие ПЦР-продукты, вырезают стерилизованным скальпелем и фрагменты ДНК выделяют с помощью системы Geneclean. При этом для получения четких результатов секвенирования фрагмента, амплифицированного с помощью набора праймеров

polhF:polhR, необходимо предварительное клонирование в стандартном векторе (так как секвенирование с помощью вырожденных праймеров может дать непредсказуемые и неоднозначные результаты). В отличие от него, праймеры L8F2 и L8R2 на 5'-конце содержат участок, соответствующий прямому и обратному праймерам M13, соответственно. Это позволяет провести непосредственное секвенирование амплифицированного фрагмента как в прямом, так и в обратном направлении, с помощью стандартных праймеров.