



УДК 635.24/24 : [632.937.16 + 57.083.3]

ДЕТЕКЦИЯ X- И M-ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ ДНК-ЗОНДОВ, МЕЧЕННЫХ ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА

*Дрыгин Ю. Ф., Афонина И. А., Байер К.,
Николаева О. В., Атабеков И. Г.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская
лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии
им. А. Н. Белозерского*

С помощью молекулярно-гибризационного теста проведена детекция M- и X-вирусов картофеля в очищенных препаратах вирусов и в экстрактах клубневой ткани. В качестве зондов использовали рекомбинантные ДНК, полученные на основе ДНК фага M13 или однонигевой плазмиды pTZ19, которые содержали последовательности, комплементарные РНК M- и X-вирусов картофеля, и были мечены пероксидазой хрена.

С помощью ДНК-зондов, способных комплементарно связываться с вирусными нуклеиновыми кислотами, присутствующими в экстрактах зараженных растений, можно диагностировать вирусные заболевания растений иммунологически — методом молекулярно-гибризационного анализа, который до сих пор проводили в основном с помощью радиоактивно меченных ДНК-зондов [1, 2]. Описаны разные способы нерадиоактивного мечения ДНК для обнаружения целевых нуклеотидных последовательностей в очищенных препаратах нуклеиновых кислот: биотином [3, 4], флуоресцентным красителем [5], ферментами [6, 7]. В качестве ферментной метки чаще всего используют пероксидазу хрена [6] и щелочную фосфатазу [6, 7]. В последнее время ДНК-зонды, содержащие перадиоактивные метки, начинают широко использовать для детекции вирусных нуклеиновых кислот *in situ* [8]. Настоящая работа посвящена детекции X- и M-вирусов картофеля в экстрактах клубневой ткани.

Нерадиоактивной диагностике предшествовал анализ рекомбинантных ДНК на специфическую реакцию гибридизации. С этой целью рекомбинантные ДНК, содержащие последовательности, идентичные ДНК-копиям РНК X- и M-вирусов картофеля, метили $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ с помощью затравки $(\text{dT})_{12-18}$ и ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова), а затем гибридизовали на фильтрах с пробами, содержащими диагностируемые вирусы или соответствующие вирусные РНК. В реакциях гибридизации радиоактивные зонды давали положительный ответ в гомологичной системе «зонд — РНК» или «зонд — вирус» или «зонд — экстракт зараженного клубня», но не давали реакции в гетерологичной системе (с вирусом табачной мозаики (ВТМ) или его РНК).

Модифицированные пероксидазой ДНК-зонды также обладали высокой специфичностью в реакции гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах с пробами соответствующих вирусов (рис. 1), хотя они уступали радиоактивным зондам по чувствительности примерно в 100 раз. Тем не менее с помощью соответствующего нерадиоактивного зонда в пробе объемом 1—2 мкл можно было определить менее 1 нг очищенного вируса и ~30 пг очищенной вирусной РНК.

Полученные результаты позволили использовать нерадиоактивные зонды для практической диагностики вирусных инфекций картофеля (X- и M-вирусов картофеля). Предварительно нами была проведена детекция вирусных РНК в суммарном препарате очищенных нуклеиновых кислот, полученных из зараженных растений.

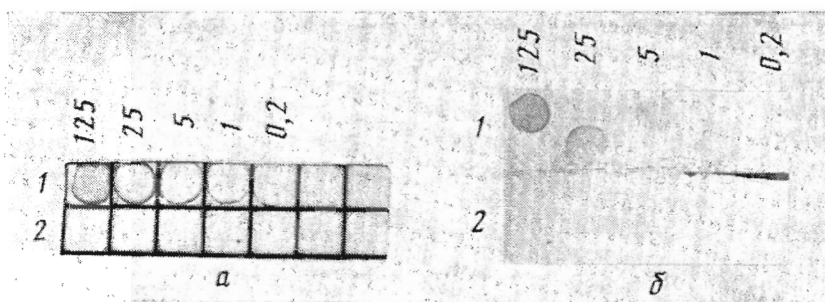


Рис. 1. Определение чувствительности детекции очищенных препаратов X- (а, 1) и M-вируса картофеля (б, 1) методом гибридизации с меченным пероксидазой ДНК-зондом: 2 — вирус табачной мозаики. Цифры сверху соответствуют количеству вируса в пятне, нг

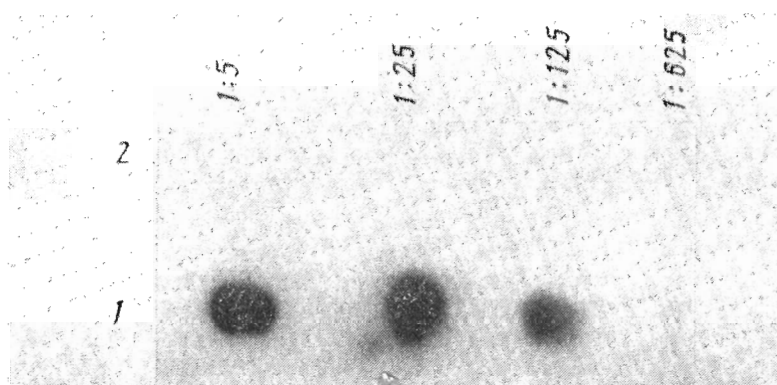


Рис. 2. Определение специфичности диагностики M-вируса картофеля с помощью гибридизации суммарной фракции нуклеиновых кислот из клубня картофеля с ДНК-зондом, меченным пероксидазой. Цифры сверху соответствуют разведению препарата нуклеиновых кислот, выделенных из 0,2 г клубня картофеля и растворенных в 20 мкл воды; в каждую точку наносили по 1 мкл: 1, 2 — нуклеиновые кислоты из зараженного и здорового клубня соответственно

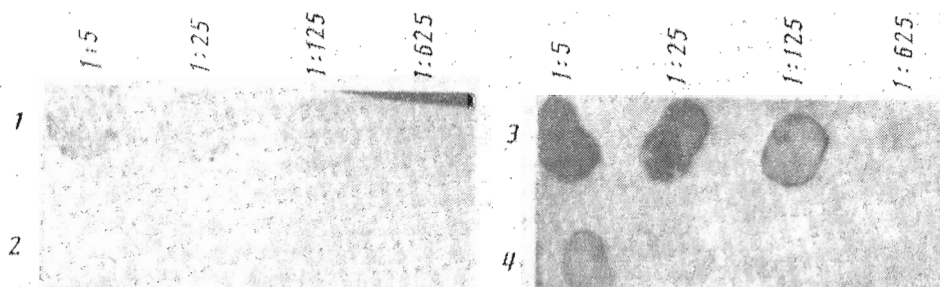


Рис. 3. Детекция X- и M-вирусов картофеля в экстрактах клубня картофеля с помощью ДНК-зонда, меченного пероксидазой: 1 — экстракт зараженного X-вирусом клубня; 2, 4 — экстракты здоровых клубней; 3 — экстракт зараженного M-вирусом клубня. Цифры сверху соответствуют разведению экстракта клубня

Известно, что при анализе суммарной фракции нуклеиновых кислот, выделенных из растительного материала, с помощью радиоактивных ДНК-зондов можно достоверно определить диагностируемую нуклеиновую кислоту [9, 10]. Результаты проведенных нами опытов по гибридизации показали, что нуклеиновые кислоты, выделенные из зараженного вирусом клубня, дают четкую положительную реакцию, тогда как фоновая реакция выделенных из здорового клубня нуклеиновых кислот практически отсутствует (рис. 2).

Для количественного определения вирусных РНК в суммарной фракции клеточных нуклеиновых кислот с помощью нерадиоактивного ДНК-зонда параллельно оценивали содержание вируса в тех же экстрактах зараженного картофеля с помощью иммуноферментного анализа. Определив количество вируса в экстракте зараженного клубня, мы установили, что в суммарной фракции нуклеиновых кислот из зараженных клубней методом гибридизации с помощью меченых пероксидазой зондов можно достоверно определить до 50 пг РНК X- и М-вирусов картофеля в пятне.

Для практической диагностики наибольший интерес представляет детекция вирусных нуклеиновых кислот непосредственно в клеточном соке растений. Нами были разработаны условия устранения неспецифической реакции модифицированного зонда с компонентами клеточного экстракта с сохранением чувствительности, необходимой для достоверного анализа (см. «Экспериментальную часть»). Выяснилось, что экстракты зараженных клубней дают специфическую цветную реакцию вплоть до 625-кратного разведения, а экстракты здоровых клубней не дают фоновой окраски при проведении реакции «субстрат — фермент» начиная с 20—25-кратного разведения экстракта (рис. 3).

Таким образом, полученные данные предполагают возможность практического применения молекулярно-гибризационного анализа с фермент-мечеными ДНК-зондами в серийной диагностике вирусных заболеваний растений или нерадиоактивной детекции целевых фрагментов нуклеиновых кислот.

Экспериментальная часть

В работе использовали биогели Р-6 и Р-20 (Bio-Rad, США), полиэтиленгликоль с M_r 6000, EDTA- Na_2 , трис, бычий сывороточный альбумин (BSA), поливинилпирролидон с M_r 360 000, додецилсульфат натрия (SDS), формамид, фиколл с M_r 400 000 (Serva, ФРГ), нитроцеллюлозные фильтры BA-85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), полистирольные платы для иммуноферментного анализа (Dynatech, Швейцария), пероксидазу хрена (Reanal, Венгрия). Прочие реактивы имели квалификацию о. ч. или были перегнаны (перекристаллизованы). Очищенные препараты вируса X картофеля и вируса табачной мозаики были любезно предоставлены В. К. Новиковым (МГУ).

Накопление и выделение М-вируса картофеля проводили по методу [11]. *Содержание X- и М-вируса картофеля в клубнях* определяли с помощью сэндвич-модификации иммуноферментного анализа [12]. В качестве контроля использовали экстракт из здоровых листьев или клубней. Содержание вируса в экстрактах клубней картофеля оценивали по калибровочным кривым, построенным исходя из данных иммуноферментного анализа известного количества вируса, добавленного к здоровому экстракту клубней картофеля.

Выделение РНК из очищенных препаратов М- и X-вирусов картофеля и вируса табачной мозаики проводили методом фенольной депротеинизации [13]. Суммарную РНК из клубней картофеля выделяли по методу [14], дополнительно переосаждая РНК 2 М хлоридом лития.

Пероксидазу хрена очищали по методу [15], использовали фермент с $RZ = A_{403}^{1\%}/A_{275} \geq 2,8$.

Подготовка образцов для анализа методом гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах. Нитроцеллюлозные фильтры смачивали дистиллированной водой, затем выдерживали 10 мин в 20-кратном SSC-буфере (3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0) и высушивали на воздухе. На подготовленные таким образом фильтры наносили по 1 мкл последовательных 3- или 5-кратных разведений РНК, очищенного препарата вируса или экстракта клубней картофеля в 10-кратном SSC. Фильтры после высушивания образцов запекали при 80° С в вакууме в течение 2 ч и подвергали предгибризации и гибридизации. Фильтры с препаратами вируса предварительно депротеинизировали, инкубируя 15 мин при 65° С

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maule A., Hull R., Donson J.* // *J. Virol. Meth.* 1983. V. 6. № 4. P. 215—224.
2. *Palukaitis P., Simons R.* // *Virology.* 1979. V. 98. № 1. P. 238—245.
3. *Leary J., Brigati D., Ward D.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. № 13. P. 4045—4049.
4. *Hutchison N., Langer-Safer P., Ward D., Hamkalo B.* // *J. Cell. Biol.* 1982. V. 95. № 2. P. 609—618.
5. *Eshaghpour H., Soll D., Crothers D.* // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 7. № 6. P. 1485—1495.
6. *Renz M., Kurz Ch.* // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 8. P. 3435—3444.
7. *Jablonski E., Moomow E., Tullis R., Ruth J.* // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 15. P. 6115—6123.
8. *Matthews J., Kricka L.* // *Analyt. Biochem.* 1988. V. 169. № 5. P. 1—25.
9. *Harrison B., Robinson D., Mowat W., Duncan G.* // *Ann. Appl. Biol.* 1983. V. 102. № 2. P. 331—338.
10. *Owens R., Diener T.* // *Science.* 1981. V. 213. № 4508. P. 670—672.
11. *Николаева О. В., Новаков В. К., Каграманов В. П., Бобкова А. Ф., Атабеков И. Г.* // *С.-х. биология.* 1985. № 2. С. 96—102.
12. *Clark M., Adams A.* // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 34. № 2. P. 475—483.
13. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэлбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
14. *Linhorst H., Kaper J.* // *Virology.* 1984. V. 139. № 2. P. 317—329.
15. *Welinder K.* // *Eur. J. Biochem.* 1979. V. 96. № 3. P. 483—502.

Поступила в редакцию
1.IX.1988

После доработки
30.I.1989

DIAGNOSTICS OF X AND M POTATO VIRUSES IN CRUDE TUBER
EXTRACTS BY NON-RADIOACTIVE DNA-PROBING

DRYGIN Yu. F., AFONINA I. A., BAYER K.,
NIKOLAIEVA O. V., ATABEKOV J. G.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University*

X and M potato viral RNAs were cloned in M13 phage system, the recombinant DNAs modified with horse radish peroxidase, i. e. DNA-probes, were used in detecting the purified viral RNAs, viruses and for diagnostics of the infected potato tubers by the spot-hybridization technique. Thirty picograms of pure RNA or fifty picograms of the RNA in crude nucleic acid preparations isolated from infected tubers were detected. 1000-fold dilutions of the infected potato tuber extracts still displayed the specific color reaction with the respective DNA-probes.