

# Zmodyfikowana metoda molekularna wykrywania wirusów sadzeniaków ziemniaka

## I. Szybka procedura CTAB do izolacji kwasów nukleinowych z bulw

### Przed izolacją:

Przygotować bufor lizujący - **CTAB**, płuczące - **Wash 1**, **Wash 2** i **Wash 3**.

- **Bufor lizujący CTAB o pH 8,0**

A	B	C
Odczynnik (stężenie końcowe)	Ilość na 1 litr	Ilość na 100 ml
CTAB (2%)	20 g	2 g
NaCl (2 M)	116,88 g	11,7 g
Tris-HCl o pH 8,0 (100 mM)	15,76 g lub 100 ml roztworu 1M Tris-HCl	1,6 g lub lub 10 ml roztworu 1M Tris-HCl
EDTA(20 mM)	7,44 g EDTA lub 40 ml roztworu 0,5 M EDTA	0,744 g EDTA lub 4 ml roztworu 0,5 M EDTA
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (1%)	10 g	1
PVP-40 (2%)	20 g	2
β-merkaptioetanol	10 ml	1 ml

- ✓ cztery pierwsze odczynniki rozpuścić na mieszadło magnetycznym w około 800 (kolumna B) lub 80 (kolumna C) ml wody destylowanej ogrzanej do około 60°C w mikrofalówce. *Podczas rozpuszczania można ustawić mieszadło (jeżeli ma blok grzejny) na 60°C lub rozpuszczać w łaźni wodnej doprowadzonej do tej temperatury.*
  - ✓ doprowadzić pH do wartości 8,0 za pomocą 1M NaOH lub HCl,
  - ✓ Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, PVP-40 i β-merkaptioetanol dodać bezpośrednio przed użyciem do roztworu (zawierającego powyższe, pierwsze cztery substancje). Butelkę z β-merkaptioetanolem otwierać pod wyciągiem i tam dodawać ten składnik.
  - ✓ Po rozpuszczeniu tych dwóch składników uzupełnić wodą wolną od nukleaz do objętości 1000 (kolumna B) lub 100 (kolumna C) ml, w przypadku dłuższego przechowywania autoklawować. Bufor zachowuje trwałość przez 2 tygodnie.
- **Wash solution 1** – 70% aceton (70 ml acetonu + 30 ml wody wolnej od nukleaz)
  - **Wash solution 2** – 70% izopropanol (70 ml 100% izopropanolu + 30 ml wody wolnej od nukleaz)
  - **Wash solution 3** – 70% etanol (729,2 ml 96% dopełnić wodą do 1L)

## Izolacja

Rozkład odczynników na płytce DW do izolacji\*:

Nazwa rzędu	Nr rzędu	Typ płytki	Odczynnik	Ilość na dołek
	A	Deep Well	PUSTA	
Tip Comb	B	Deep Well	KingFisher™ Duo 12-Tip Comb	
Sample	C	Deep Well	Lizat z bulw	400 µl
			RNA Binding Beads	25 µl
			96% Etanol	400 µl
Wash 1	D	Deep Well	Wash Solution 1	800 µl
Wash 2	E	Deep Well	Wash Solution 2	800 µl
Wash 3_1	F	Deep Well	Wash Solution 3	800 µl
Wash 3_2	G	Deep Well	Wash Solution 3	800 µl
	H	Deep Well	PUSTA	

\*W przypadku stosowania robota innego niż KingFisher™ DuoPrime, należy procedurę dostosować do wymogów urządzenia, np. stosując dla poszczególnych etapów osobne płytki DW w całości napełnione poszczególnymi roztworami.

1. Bulwy pobrane spod 234 krzaków umyć do czysta pod bieżącą wodą i zostawić do wyschnięcia. Podzielić na 9 grup po 26 bulw każda.
2. Napełnić pojemniki homogenizacyjne (o objętości 50 ml) 10 ml buforu lizującego CTAB i dodać kulki stalowe odpowiednie dla średnicy pojemnika.

*Pojemniki do homogenizacji prób można przygotować kilka dni wcześniej i trzymać szczelnie zamknięte w temperaturze pokojowej.*

3. Wycinać około 20 mg tkanki z bulw z części przystolonowej lub z oczek bezpośrednio do pojemnika homogenizacyjnego wypełnionych buforem lizującym. Do jednego pojemnika wyciąć próby z 26 bulw.

*Między pojemnikami stosować nowe narzędzie do wycinania (ostro zakończony obierak lub stalową łyżeczkę do ważenia małych ilości). Można sterylizować użyte w 2% wiroknie (lub 5% domestosie) i optukać wodą przed ponownym stosowaniem.*

*Można pobrać najpierw próby z bulw i je np. zamrozić w -80°C a bufor i kulki dodać przed izolacją.*

4. Homogenizować dodanymi kulkami stalowymi na robocie TissueLyser II lub Geno/Grinder lub innym tego typu.

*Alternatywnie, można próby łączone homogenizować wsypując daną próbę łączoną do zimnego moździerza i ucierać w ciekłym azocie a następnie dodać 10 ml buforu lizującego. Można również ucierać w woreczkach do homogenizacji z siatką.*

*W takim przypadku do woreczka należy włożyć dla jednej próby łączonej próby pobrane z 26 bulw, dodać 10 ml buforu, zamknąć worek i homogenizować go ręcznie lub na dedykowanym urządzeniu. Homogenat przenieść do próbek wirówkowych.*

5. Inkubować 5 min w 65°C w bloku termicznym, łaźni wodnej, lub 10 min w cieplarni.
6. Wyjąć kulki bagietką z magnezem, wirować 12000g x 10 min w celu osadzenia części stałych, piany oraz skroplin z parowania (po tym etapie można przechowywać próbki do 5 dni w lodówce w 4°C)
7. Przenieść 400 ul lizatu na przygotowaną płytkę DW wg tabeli wyżej (płytki DW można napełnić odpowiednimi roztworami kilka dni wcześniej i przechowywać szczelnie zamknięte w temperaturze pokojowej).
8. KingFisher™ Duo Elution Strip napełnić wodą wolną od nukleaz (po 100 µl do 12 studzienek).
9. Wstawić płytkę DW oraz strip elucyjny do odpowiednich miejsc w robocie KingFisher DuoPrime. Uruchomić program: CTAB\_20\_min (KingFisher DuoPrime). *Plik można uzyskać od autora procedury).*
10. Po 20 minutach wyjąć płytkę i strip elucyjny z preparatami RNA. Strip można zamknąć dedykowanym paskiem zamykającym i umieścić w ramce na 8 stripów (96 preparatów RNA).
11. Preparaty RNA przechowywać w -20° lub -80°C lub bezpośrednio wykonywać test RT-qPCR wg procedury opisanej w punkcie II.

## II. Real-time RT- PCR

Tabela 1 Sekwencje starterów i sond

Starter	Wirus	Sekwencja (5'-3')	Źródło
PVS-1 for PVS-1 rev PVS-1 probe	PVS	AAGTGGTGATCATGTGTGCAAGCG ATTGCAATGATCGAGTCCAAGGGC Cy5-ACTGTGGAGTTCCCAACAGGCGCAGT-BHQ2	Mortimer-Jones i in. (2009)
PVA-FWD PVA-REV PVA-Probe	PVA	AGGTACTGCTGGGACTCATTGAG RACACTTTACCTTTGAGCATTGG Cyan500-CCACGCTTAAAAATCAATGACATCAAACTGACACT-BHQ1	Lacomme i in. (2015)
PVX-1 for PVX-1 rev PVX-1 probe	PVX	AAGCCTGAGCACAAATTCGC GCTTCAGACGGTGGCCG Red610-AATGGAGTACCAACCCAGCTGCC-BHQ2	Agindotan i in. (2007)
PSTV-231F PSTV-296R PSTV-251T	PSTVd	GCCCCCTTTGCGCTGT AAGCGGTTCTCGGGAGCTT FAM-CAGTTGTTCCACCGGGTAGTAGCCGA-BHQ1	Boonham i in. (2004)
PLRV F PLRV R PLRV Probe	PLRV	GGCAATCGCCGCTCAA TGTAACACGAATGTCTCGCTTG Cy5-CCTCGTCTCGGGAACTCCAGTT-BHQ-2	Boonham i in. (2009)
KT8440MF KT8543MR KT8483MP	PVM	CCAATGTGTTTACTACTAGGTG ATCACCTCGGTACTCCTTC Red610-CTGGTATCTTACAATGTGCGCG BHQ-2	niepublikowane
PVY-1 FP PVY-1 RP PVY-1 Probe	PVY	CCAATCGTTGAGAATGCAAAAC ATATACGCTTCTGCAACATCTGAGA FAM-TTAGGCAAATCATGGCACAT-BHQ-1	Singh i in. (2013)
COX F COX R COXOL1511T Probe	Cox	CGTCGCATTCCAGATTATCCA CAACTACGGATATATAAGRRCRRAACTG Cyan500-AGGGCATTCCATCCAGCGTAAGCA-BHQ1	Boonham i in. (2009)

Fluorofory oraz ich długość światła wzbudzenia i emisji fluorescencji (LightCycler 480 System II):

Cy5 618-660

Joe/HEX 533-580

Texas Red 533-610

FAM 465-510

Mieszanki reakcyjne dla mastermix TaqPath™ 1-Step Thermofisher

*Tabela 1 Reakcja dla wirusów PVY, PVM i PLRV + kontrola wewnętrzna Cox*

Odczynnik	x 1 reakcja	x 100 reakcji
TaqPath™1-Step Multiplex	2,5µl	250µl
PVY-1 FP	0,15µl	15µl
PVY-1 RP	0,15µl	15µl
PVY-1 Probe	0,2µl	20µl
PLRV F	0,15µl	15µl
PLRV R	0,15µl	15µl
PLRV Probe	0,2µl	20µl
KT8440MF	0,15µl	15µl
KT8543MR	0,15µl	15µl
KT8483MP	0,2µl	20µl
COX F	0,15µl	15µl
COX R	0,15µl	15µl
COXOL1511TProbe	0,1µl	10µl
Woda	3,7µl	370µl
RNA	2,5µl	

*Tabela 2 Reakcja dla wirusów PVA, PVS, PVX i wiroida PSTVd*

Odczynnik	x 1 reakcja	x 100 reakcji
TaqPath™1-Step Multiplex	2,5µl	250µl
PVS-1 for	0,15µl	15µl
PVS-1 rev	0,15µl	15µl
PVS-1 probe	0,2µl	20µl
PVA-FWD	0,15µl	15µl
PVA-REV	0,15µl	15µl
PVA-probe	0,2µl	20µl
PVX-1 for	0,15µl	15µl
PVX-1 rev	0,15µl	15µl
PVX-1 probe	0,2µl	20µl
PSTV-231F	0,15µl	15µl
PSTV-296R	0,15µl	15µl
PSTV-251T	0,2µl	20µl
Woda	3,6µl	360µl
RNA	2,5µl	

**Warunki reakcji:**

TaqPath™ 1-Step Multiplex:

25°C-2min,

53°C-10min,

95°C-2min,

40 x (95°C-15sek, 60 °C-1min)

Wyniki C<sub>q</sub> uzyskane w trakcie amplifikacji należy przeanalizować w oprogramowaniu stosowanego termocyklera stosując kontrole negatywne (NC – RNA ze zdrowych roślin) oraz kontrole bez matrycy (NTC – woda zamiast RNA) do ustalenia wartości progowych dla danej płytki.

Po wyznaczeniu liczby pozytywnych prób łączonych porażenie ocenianych sadzeń szacować stosując arkusz kalkulacyjny SeedCalc Excel udostępnianego przez International Seed Testing Association (ISTA) <https://www.seedtest.org/en/services-header/tools/statistics-committee/statistical-tools-seed-testing.html>