

ФГБНУ ВСТИСП

**Выделение РНК из растительных
тканей малины и смородины
черной для идентификации
вирусов RBDV и BRV**

м.н.с. Чердакли А.А.

м.н.с. Радзениеце С.

г. Москва



Черная смородина и малина являются ведущими ягодными культурами в России. Россия занимает третье место по возделыванию черной смородины, после Польши и Германии (Hummer К.Е., Barney D. Currants // HortTechnol.2002. V. 12. No 3. P. 377-387) и имеет валовый сбор малины 120 тыс.тонн в год (по данным апяпм, <http://asprus.ru>)



Вирус реверсии смородины черной BRV (<https://agrartex.ru>)



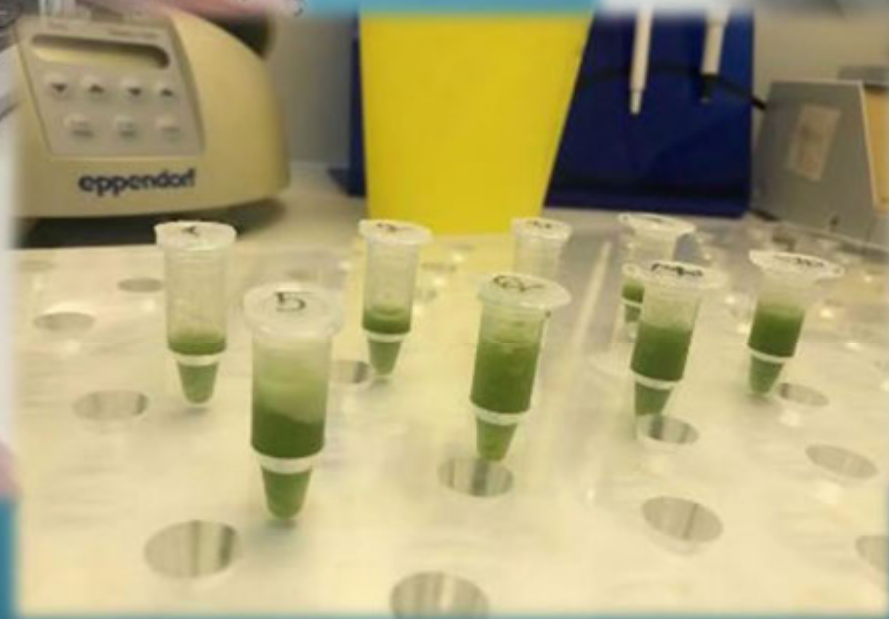
Вирус кустистой карликовости малины RBDV (<http://asprus.ru>)



Выделение РНК проводили с помощью гуанидин-тиоцианатного и гуанидин-гидрохлоридного буферов, по методике (W.Menzel, W.Jelkmann, E.Maiss, 2002 год) с модификациями

№ образца	Культура	Название сорта	Метод выделения
1	Земляника	Лакомая №1	Гуанидин-тиоцианат (4М)
2	Смородина черная	Орловский Вальс	Гуанидин-тиоцианат (4М)
3	Малина	Солнышко	Гуанидин-тиоцианат (4М)
4	Малина (<i>in vitro</i>)	Калашник	Гуанидин-тиоцианат (4М)
1.1	Земляника	Лакомая №1	Гуанидин-тиоцианат (5М)
2.1	Смородина черная	Орловский Вальс	Гуанидин-тиоцианат (5М)
3.1	Малина	Солнышко	Гуанидин-тиоцианат (5М)
4.1	Малина (<i>in vitro</i>)	Калашник	Гуанидин-тиоцианат (5М)
1.2	Земляника	Лакомая №1	Гуанидин-гидрохлорид (6М)
2.2	Смородина черная	Орловский Вальс	Гуанидин-гидрохлорид (6М)
3.2	Малина	Солнышко	Гуанидин-гидрохлорид (6М)

Проведение пробоподготовки



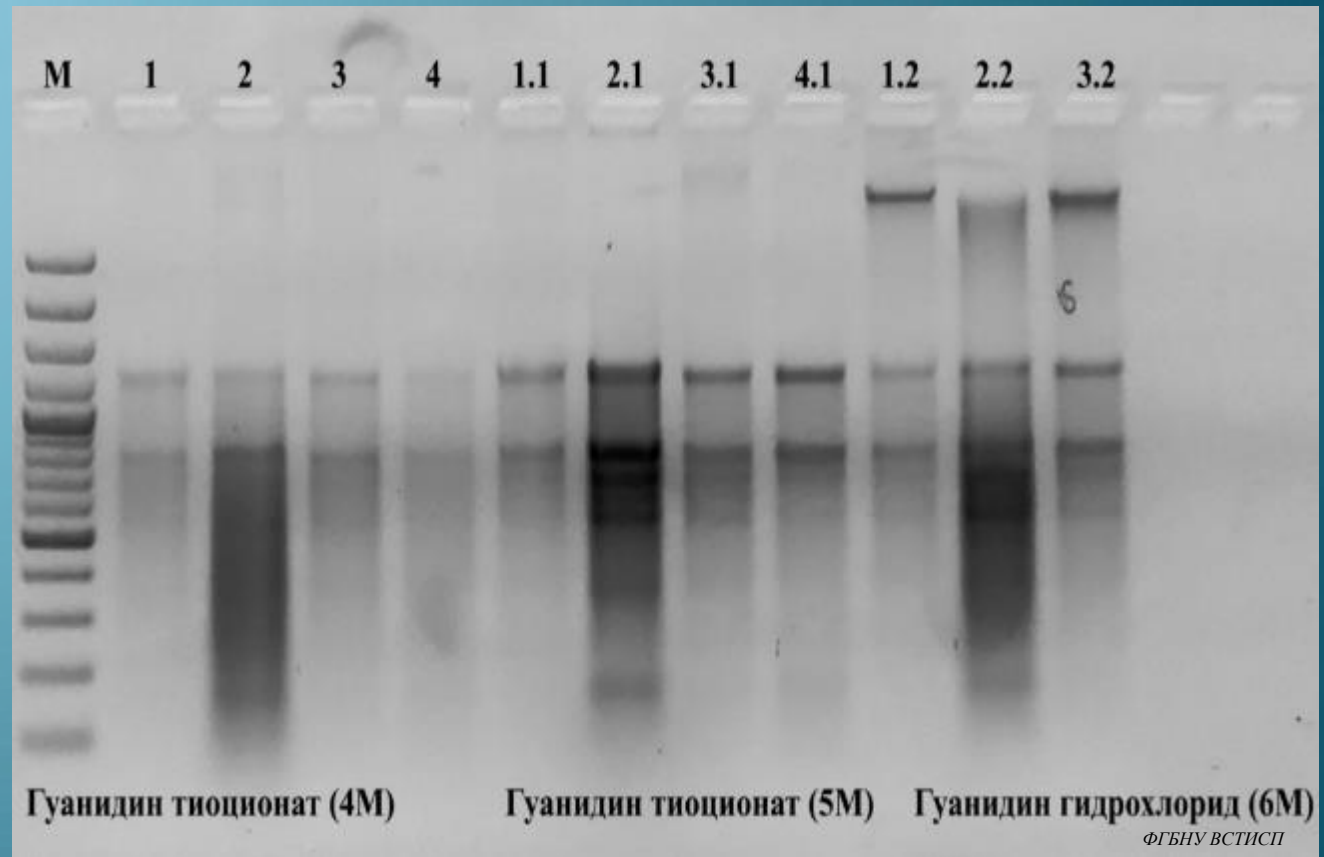
Выделение РНК

Для проведения химического лизиса клеток растительных тканей малины и смородины черной использовали три варианта буферов:

- ▣ Гуанидин-тиоционат (4М);
- ▣ Гуанидин-тиоционат (5М);
- ▣ Гуанидин-гидрохлорид (6М).

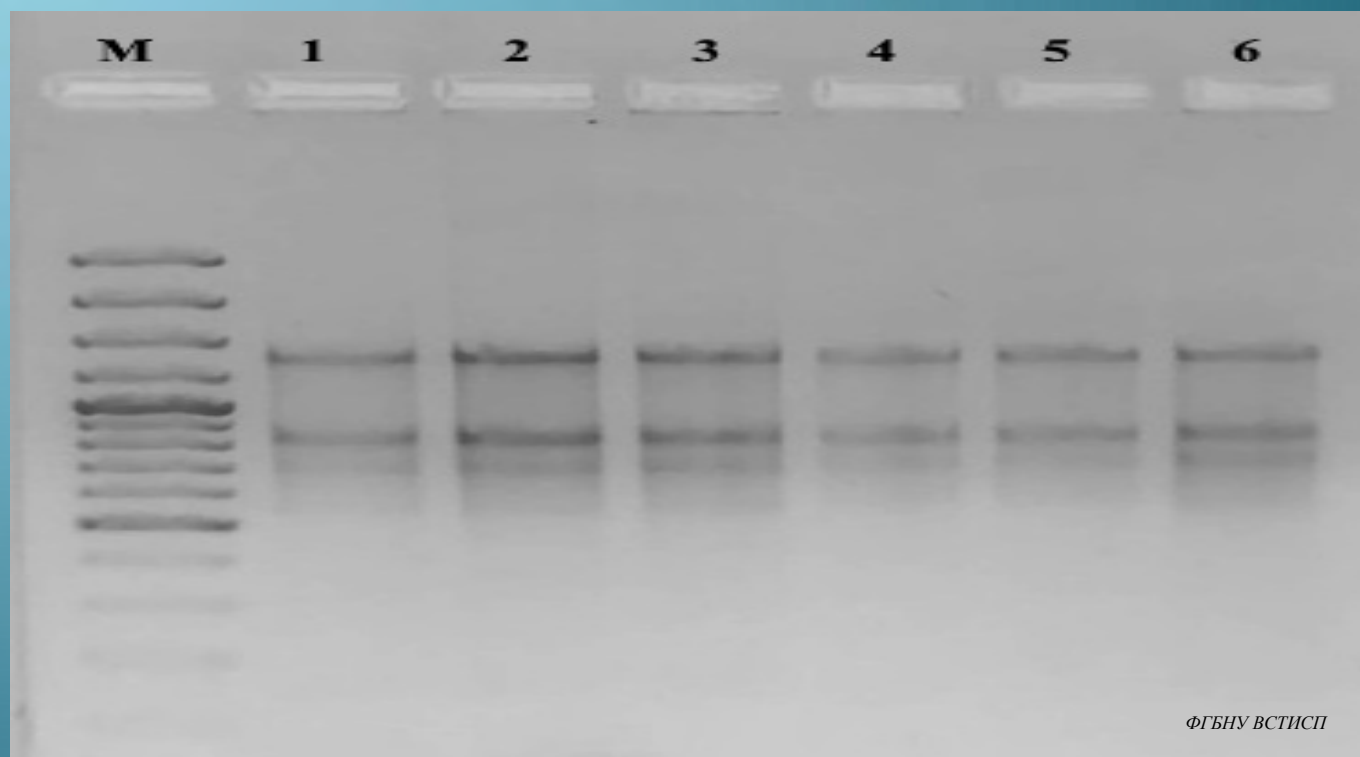
Выделение РНК

Полученную РНК разделяли путем электрофореза в 2% агарозном геле в буфере 1x TAE



Использовали молекулярный маркер (М) 100 bp

По результатам качества выделенной РНК пришли к заключению, что лучше использовать гуанидин-тиоционатный буфер (5М). В протокол выделения (W.Menzel, W.Jelkmann, E.Maiss, 2002 год) добавили этап третьей промывки ацетоном с целью сокращения времени высыхания силикатных частиц с РНК



Суммарная РНК ,2% гель, молекулярный маркер (М) 100 бр
1- смородина черная (Орловский Вальс), 2- смородина черная (Чародей), 3-смородина черная (Брянский Агат), 4- малина (Солнышко), 5- малина (Арбат 492) ,6- малина (Арбат 490)

Проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

Обратная транскрипция проводилась по методике thermoscientific (Protocol for Strand cDNA Synthesis #EP0441) с добавлением дополнительных компонентов

5× Reaction Buffer

Thermo scientific RiboLock RNase Inhibitor

dNTP Mix, 10 mM each

RevertAid Reverse Transcriptase

Random primer

Общий объем реакционной смеси (р.с.) составлял 25 мкл, р.с. имела такой состав:

Количество реакций - 1

5× микс - 5

Праймер F - 1

Праймер R - 1

кДНК - 1

MQ - 17



Последовательности праймеров

Название праймера	Последовательность	Длина фрагмента
BRV H609	CTT AAA GCG GCC ATC GTT CAGT	334 bp*
BRV C942	CGT ATC AAT CGG GAC CTC ATC	
RBDV F	GGG TTT GTA CTC CTG AGA	220 bp
RBDV R	CTT CCG AGA AGG TAA TCA AC	

***Developed by the Canadian Food Inspection Agency (CFIA) and user with their permission.**

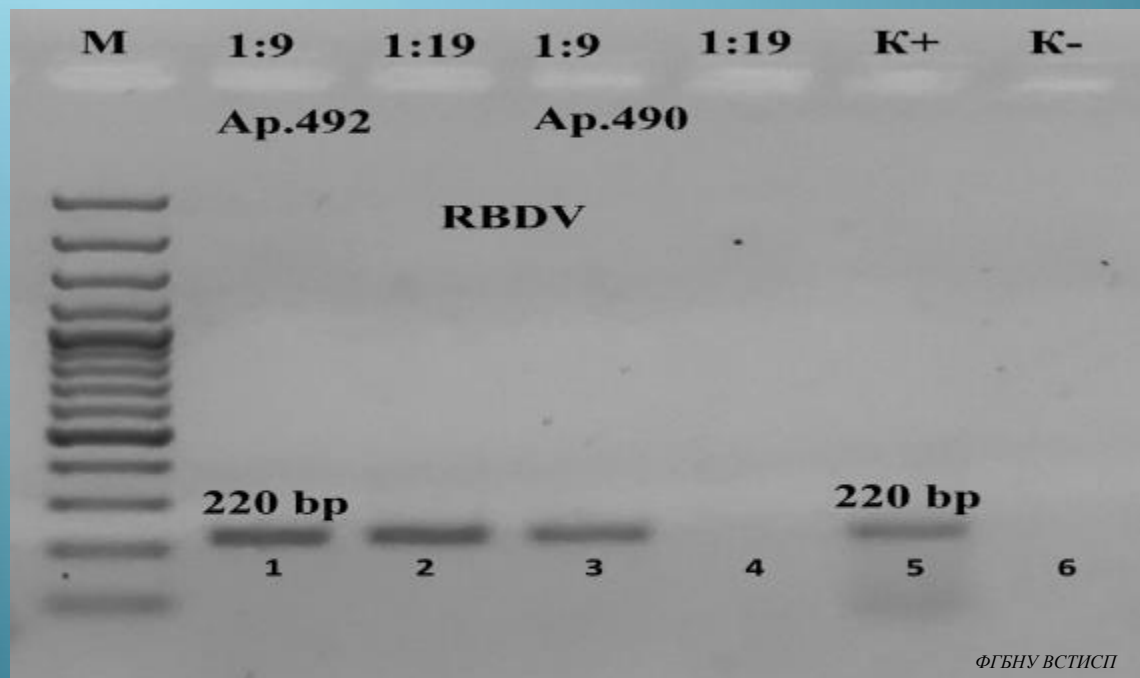
***Ribes* Post-Entry Quarantine Testing Manual, 9 July 2007**

Праймеры на идентификацию вируса кустистой карликовости малины (RBDV) были разработаны на основании базы данных Национального центра биотехнологической информации NCBI в лаборатории репродуктивной биотехнологии ФГБНУ ВСТИСП



Амплификацию проводили в термоциклере BioRad C1000 Touch. Температурные условия для ПЦР были следующими: начальная денатурация $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 3 минуты, денатурация $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 30 с, отжиг праймеров $+62\text{ }^{\circ}\text{C}$ (RBDV), $+65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BRV) - 30 с, элонгация $+72\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 45 с, 38 циклов, конечная элонгация $+72\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 7 минут. Полученные ПЦР-продукты разделяли путем электрофореза в 2 % агарозном геле в буфере 1x TAE

Полученные результаты

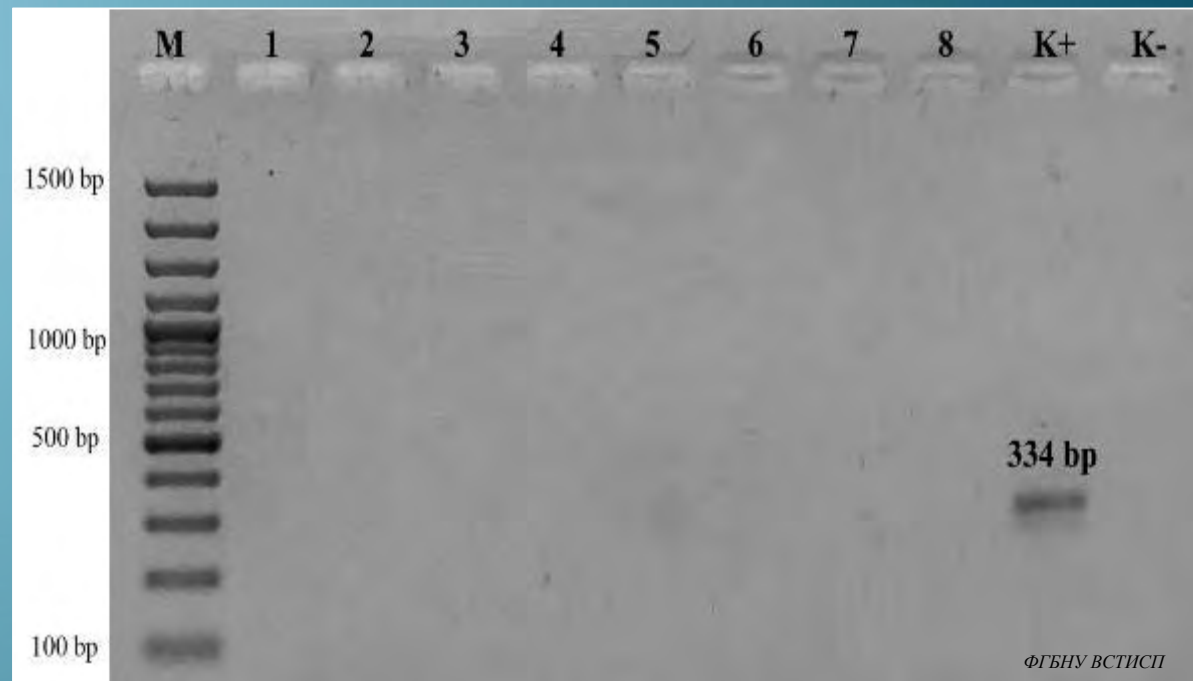


В исследуемых образцах малины выявлен вирус кустистой карликовости малины (RBDV)
ПЦР-продукт разгоняли в агарозном геле (2%),
Использовали молекулярный маркер (M) 100 bp

1- сорт малины Арбат 492 (разведение 1:9),
2 - сорт малины Арбат 492 (разведение 1:19),
3 - сорт малины Арбат 490 (разведение 1:9),
4 - сорт малины Арбат 490 (разведение 1:19),
5 - положительный контроль, 6-
отрицательный контроль

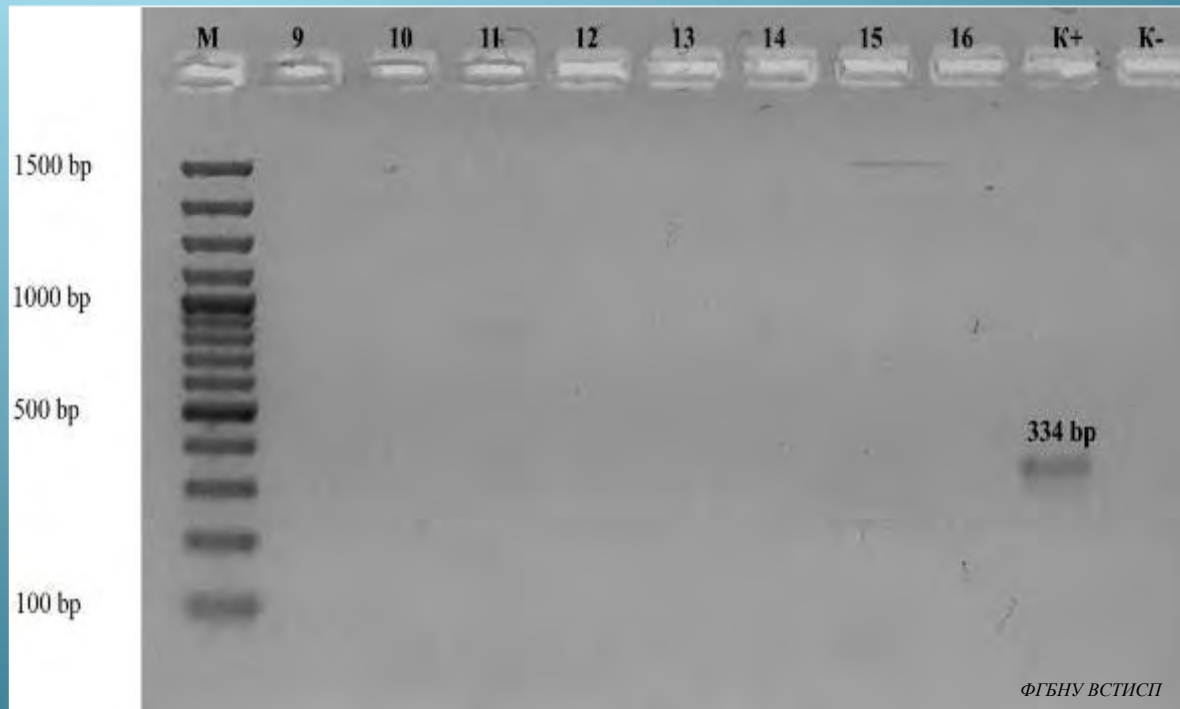
Полученные результаты

В исследуемых образцах смородины черной не выявлен вирус реверсии смородины черной (BRV)



М 100 Вр, 1 – Чародей 106, 2 - Чародей 107, 3 - Брянский Агат 104, 4 - Гамаюн 116, 5 - Бармалей 100, 6 - Вера 108, 7 - Брянский Агат 105, 8 - Брянский Агат 103, (К+)- положительный контроль, (К-) -отрицательный контроль

Полученные результаты



В исследуемых образцах смородины черной не выявлен вирус реверсии смородины черной (BRV)

М 100 bp, 9 - Брянский Агат 113, 10 - Бармалей 101, 11- Гамаюн 102, 12 - Вера 109, 13 - Миф 111, 14 - Миф 112, 15 - Вера 110, 16 - Кудесник 114, (К+)- положительный контроль, (К-) - отрицательный контроль

Спасибо за внимание

