



## Uvod

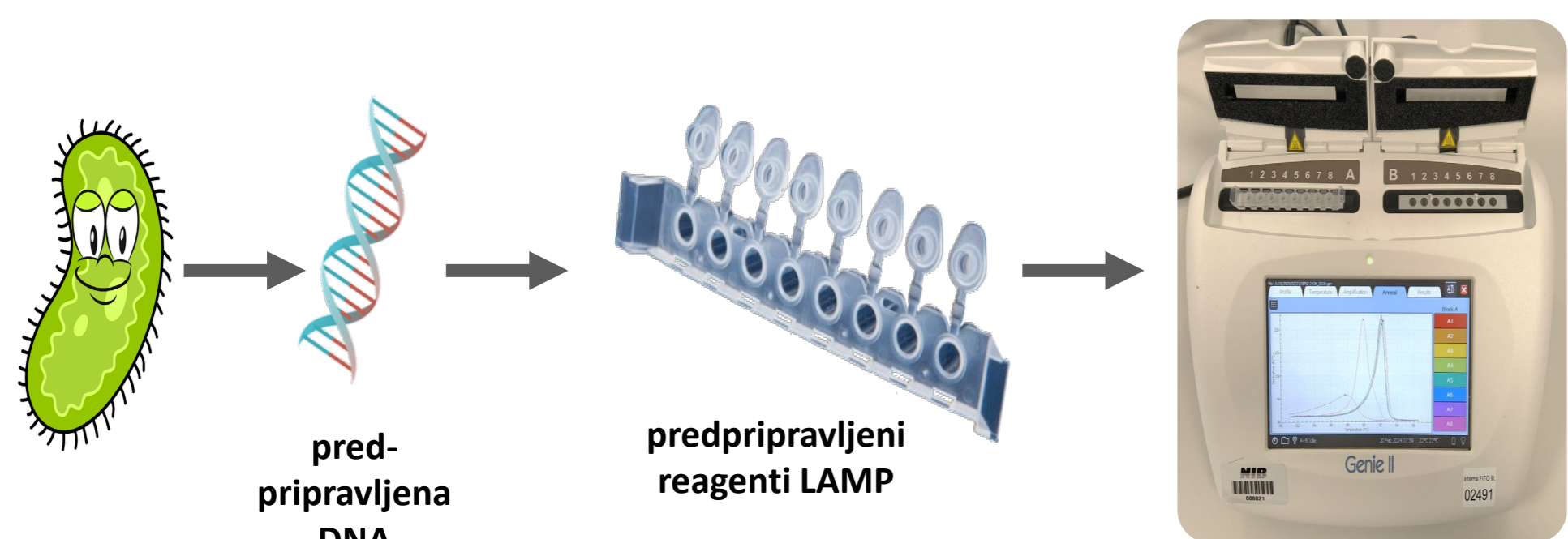
Bakterije kompleksa vrst *Ralstonia solanacearum* povzročajo med drugim tudi rjavo gnilobo krompirja. Tehnologija LAMP (angl. "Loop-Mediated Isothermal Amplification") se je izkazala kot obetavno diagnostično orodje za hitro odkrivanje tovrstnih okužb. Pri tem je posebnega pomena ocena njegove izvedljivosti, ovrednotenje njegovega delovanja in stabilnosti v terenskih razmerah.



Slika 1: Krompirjev gomolj okužen z bakterijo *Ralstonia solanacearum* in značilnim belim bakterijskim izcedkom. Vir: NIB, 2024.

V projektu Q-Entry (V4-2023) smo želeli poenostaviti testiranje na terenu in zmanjšati tveganje kontaminacije z izvedbo celovite študije stabilnosti v naprej pripravljenih oligonukleotidov in pozitivnih kontrolnih materialov za test LAMP, za zaznavanje bakterij *Ralstonia* spp. [1, 2]. Rezultate smo ovrednotili s primerjavo kvalitativnih rezultatov in časa do pozitivne reakcije v različnih časovnih intervalih z začetnimi ugotovitvami.

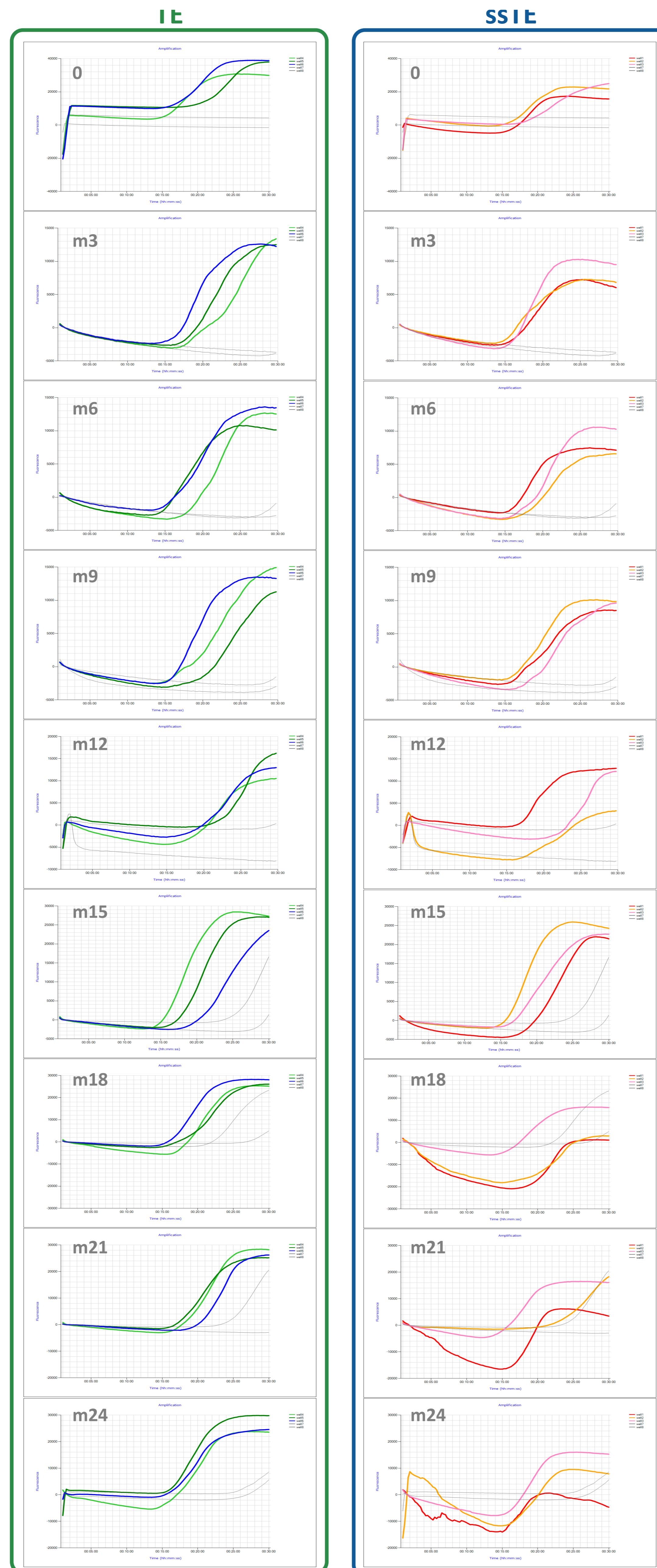
## Materiali in metode



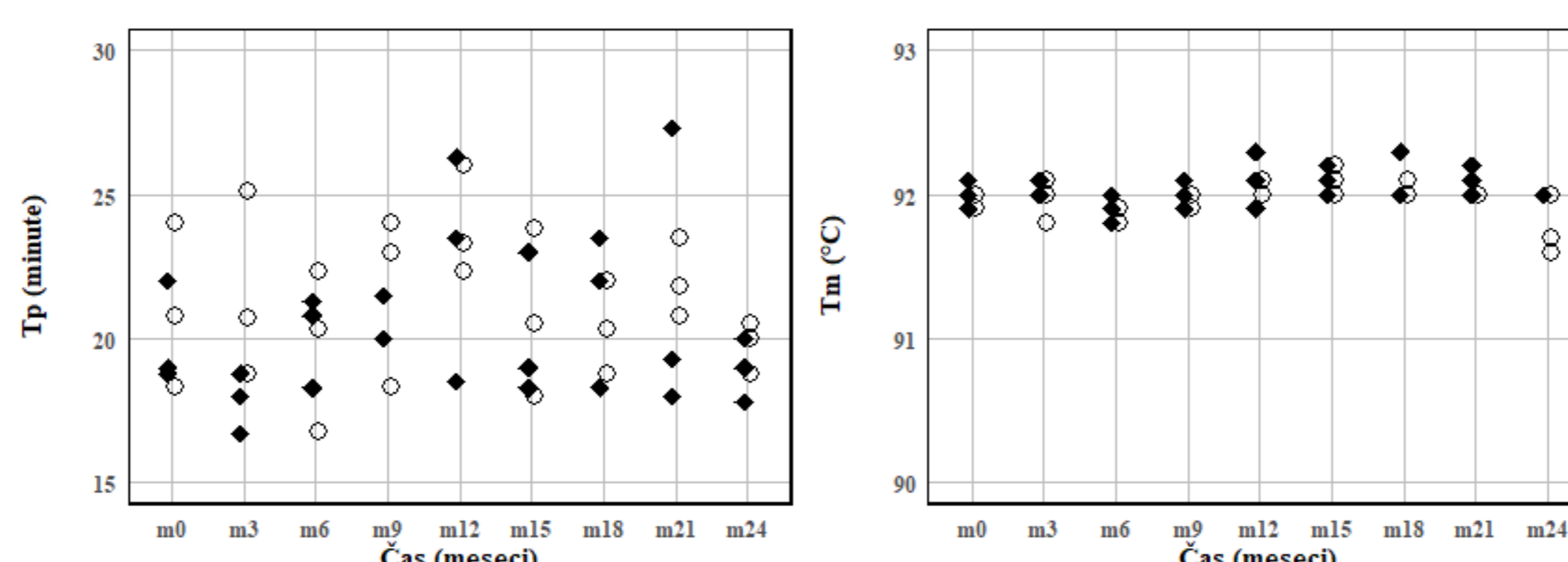
Slika 2: Shema poskusa.

- stabilnost reagentov in kontrolnih materialov (DNA bakterije *Ralstonia solanacearum* NCPPB 4156 NIB Z 30) izvajali 24 mesecev (3 mesečni časovni intervali)
- izolacija DNA iz bakterijske suspenzije z kompletom QuickPick Plant Kit, Bionobile
- ustrezne koncentracije DNA dobili z redčenjem v pufru Tris-EDTA (TE-DNA) brez ali z dodatkom eksterne DNA netarčnega organizma (DNA spermijev lososa, ssTE-DNA)
- testni trakovi z vsemi potrebnimi oligonukleotidi
- v posamezni časovni točki oligom dodali Isothermal Master Mix MM ISO-001, OptiGene
- kontrolne materiale in reagente smo do posamezne točke analize hranili zamrznjene ( $\leq -15\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
- v vsaki časovni točki smo izvajali meritve posamezne oblike DNA (TE-DNA in ssTE-DNA) v 3 tehničnih ponovitvah (reakcijah) in negativne kontrole (NTC; voda za molekularno biologijo) v 2 tehničnih ponovitvah (reakcijah)
- testiranje izvedeno na instrumentu Gene II, OptiGene

## REZULTATI



Slika 3: Grafi amplifikacijskih krivulj kontrolnih materialov in negativnih kontrol (sivo) na aparaturi Gene II. Prikazane krivulje smo analizirali v programu Gene Explorer v2.0.7.11 (OptiGene) z normalizacijo med 0 in 180 sekundami in glajenjem 2 točk.



Slika 4: Rezultati testiranja stabilnosti predpripravljenih reagentov glede na rezultat časa pozitivnosti reakcije ( $T_p$ ) in določene talilne temperature produkta ( $T_m$ ). Za vsako časovno točko izraženo v mesecih od začetka študije so prikazane vrednosti treh tehničnih ponovitev za kontrolni material pripravljen v pufru TE (prazni krožec) in pufru TE z dodatkom eksterne DNA (polni krožec).

- ✓ Kontrolni materiali so dali pozitivne rezultate na aparatu Gene II v vseh časovnih točkah (Slika 3).
- ✓  $T_p$  je nekoliko nihal tako znotraj reakcije kot tudi med časovnimi točkami. Talilna temperatura ( $T_m$ ) je bila bolj stabilna (od 91,6 do 92,3, povp.  $92,0 \pm 0,14\%$ ) (Slika 4) in v kombinaciji s časom pozitivnosti ostaja zanesljiv pokazatelj specifičnega pomnoževanja.
- ✓ Kontrolna DNA je bila stabilnejša v TE pufru.
- ✓ Zaključimo lahko, da so predpripravljeni reagenti in kontrolni materiali dovolj stabilni vsaj 24 mesecev.
- ✓ S predhodno pripravo reagentov in kontrolnih materialov učinkovito ločimo dele procesa, za katere sta koristna nadzorovano okolje in specializirana oprema (za delo z majhnimi volumni), od dejanskega izvajanja testov na terenu. S tem omogočimo izvedbo LAMP z manj specializirane opreme tudi manj izkušenim operaterjem, ki teste redkeje izvajajo.
- ✓ Glede na izkušnje z določanjem bakterije *Xylella fastidiosa* v žuželkah sklepamo, da so opisane poenostavitve postopka perspektivne tudi za področje entomologije.

## Viri

[1] Lenarčič *in sod.* (2014). PLoS ONE 9, e96027. 10.1371/journal.pone.0096027; [2] Pirc *in sod.* (2021). In *Solanum tuberosum Methods in Molecular Biology*, D. Dobnik, K. Gruden, Ž. Ramšak, and A. Coll, eds. (Springer US), pp. 401–413. 10.1007/978-1-0716-1609-3\_20; [3] Yabuuchi *in sod.* (1995). *Microbiology and Immunology* 39, 897–904. 10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x; [4] PM 7/21 (3). EPPO Bulletin 52, 225–261. 10.1111/epp.12837.

## Zahvala

Raziskovalni program Biotehnologija in sistemska biologija rastlin (št. P4-0165) je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARIS) iz državnega proračuna. Ciljni raziskovalni projekt št. V4-2003, Vpeljava hitrih testov za identifikacijo karantenskih škodljivih organizmov, povzročiteljev boleznih in poškodb na rastlinah (Q-Entry), sta financirala Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARIS) iz državnega proračuna.