



Разработка тест-системы ПЦР в реальном времени для идентификации вируса южной мозаики бобов (SBMV)

Авторы: Бондаренко Г. Н., Магомедова К.Н., Шилкина Н.А.

Организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» ФГБУ «ВНИИКР»

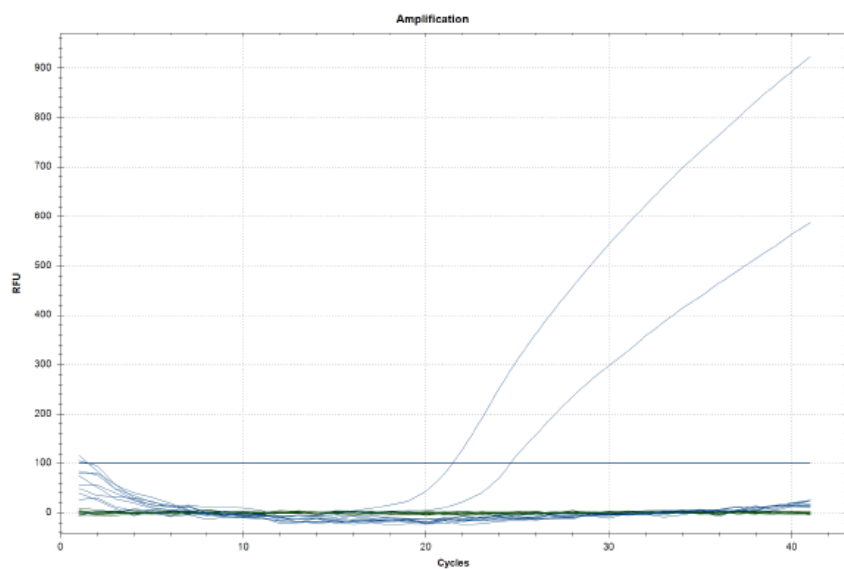
Актуальность: в работе рассматривается вирус южной мозаики бобов (Southern bean mosaic virus, SBMV) как объект исследования, с акцентом на его фитосанитарный риск для экспорта сои из Российской Федерации. Основной целью работы является разработка высокочувствительного метода идентификации SBMV. В ходе исследования обобщены литературные данные о биологических и молекулярно-генетических характеристиках патогенного вируса, а также о методе его выявления и идентификации. Также проведена оценка ранее разработанных праймерных систем, в результате чего были созданы собственные праймеры для целевого патогена. Полученные результаты могут способствовать улучшению диагностики и контроля распространения вируса, что имеет важное значение для сельского хозяйства и экспортного потенциала сои в России.

Материалы и методы:

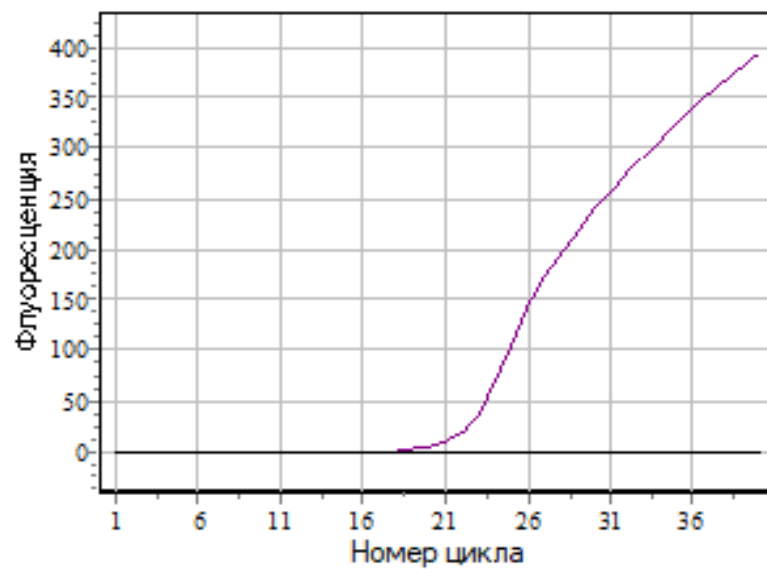
В данной работе были исследованы образцы сои из разных регионов Российской Федерации и рассмотрены существующие методы идентификации SBMV, с дальнейшей апробацией праймерных систем и секвенированием. В статье (R. M. Mulenga al. 2020) описан способ, который основан на ПЦР в формате фореа, который позволяет идентифицировать фрагмент ДНК вируса южной мозаики (SBMV) длиной 870 п.н. из внутренней области, близкой к 3 концу, кодирующей последовательности ORF2 генома SBMV. В данном способе идентификации патогена используется амплификация участка гена 32 п.н. 5'UTR, 492 п.н. белка движения 41 (ORF1) и 353 п.н. частичного гена P2a (ORF2) SBMV с помощью праймеров, комплементарных идентичной последовательности для всех штаммов SBMV. После амплификации проводится электрофоретическое разделение в агарозном геле для подтверждения амплификации нужной длины в 870 пар нуклеотидов.

Для разработки тест-системы в режиме реального времени провели высокопроизводительное секвенирование вышеописанного участка генома вируса с дальнейшим множественным выравниванием и подбором праймеров с помощью программы Primer-BLAST и поиск специфичного зонда в программе BioEdit. Изолят SBMV был использован из ИФА набора DSMZ (Германия). Для регистрации результатов амплификации ДНК используется один канал детекции FAM, который детектирует амплификацию контроля на наличие растительной ДНК. Если пороговый цикл FAM превышает 39 или отсутствует, это указывает на отсутствие в образце целевого патогена SBMV.

Разработка праймера и зонда является критическим шагом в разработке тест-системы, и он должен содержать внутривидовые консервативные последовательности и межвидовой полиморфизм. Несколько геномных последовательностей близкородственных видов из семейства Собемовирусов были выровнены для получения короткого, внутривидового и межвидового консервативного фрагмента. Был определен короткий фрагмент области, отвечающий требованиям (таблица 1). ПЦР поставлен на двух амплификаторах - CFX 96 Touch и ДТ-прайм (рисунок 1,2)



1



2

Название праймера	Последовательность 5'-3'	Tm, °C	GC, %
SBMV-K	TTGGTGCATTGXXXXXXXXXA	59	45
SBMV-M	GGXXXXXXXXAACGTCTACGA	59	55
SBMV-N	CAGACXXXXXXXXXXCTGTCAGAG	70	54

Таблица 1. Характеристика праймеров SBMV-F/SBMV-R, зонда SBMV-P, разработанных для проведения скринингового теста на наличие SBMV методом ПЦР РВ