

ДНК диагностика фитопатогенов



Методы диагностики

- Визуальный
- Индикаторные растения
- Электронная микроскопия
- Серологическая диагностика
- ДНК диагностика



ДНК диагностика

- Полимеразная цепная реакция – ПЦР
 - Традиционная ПЦР
 - ПЦР в реальном времени
 - Детекция после ПЦР (end-point detection)
 - Биочипы
-

ДНК диагностика

- Сбор материала
 - Экстракция нуклеиновых кислот (ДНК, РНК)
 - Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР)
 - Регистрация сигнала
 - Обработка результатов
-

Полимеразная цепная реакция – ПЦР

- После проведения реакции из одной молекулы ДНК образуется миллионы идентичных копий
-

ДНК диагностика

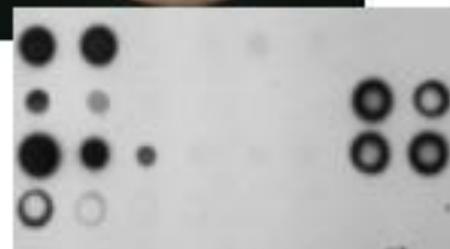
1. Диагностика урогенитальных инфекций (хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз, кандидоз и др.).
2. Вирусные заболевания (гепатиты В и С, вирус папилломы человека, ВИЧ).
3. Детекция микобактерий туберкулеза.
4. Изучение экспрессии генов в различных тканях
5. Анализ SNPs.
6. Детекция трансгенов.
7. Применение в селекции растений.
8. Детекция фитопатогенов.

Детекция фитопатогенов

- Контроль безвирусного посадочного материала
- Детекция вириодов
- Детекция фитоплазм
- Детекция вирусов в насекомых-переносчиках



Используется с 1995 г.



Диагностика должна быть:

- Быстрой
 - Дешевой
 - Точной
 - Чувствительной
 - Широко применимой
 - Воспроизводимой
-

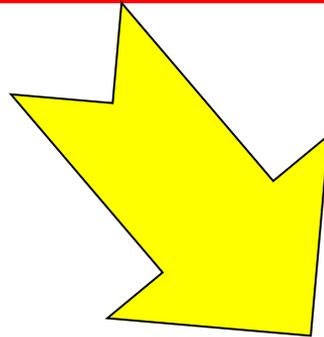
Подходы к диагностике

- Одновременный анализ большого количества образцов на один фитопатоген
- Анализ в одном образце большого числа фитопатогенов



Традиционная ПЦР

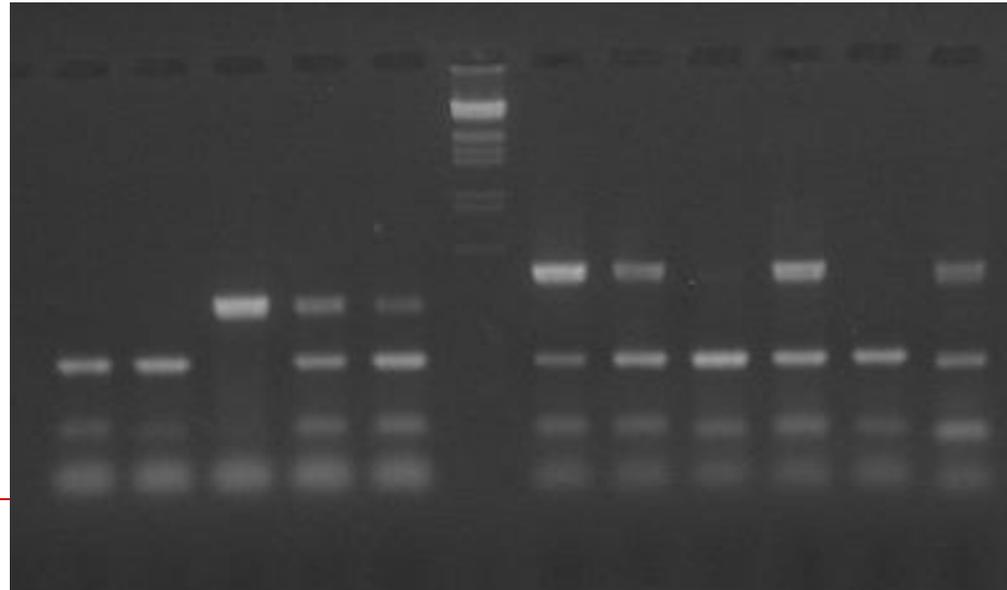
1. Быстрота анализа.
2. Высокая точность.
3. Воспроизводимость.
4. Простота, легкость в применении.



Широкое распространение

Недостатки традиционной ПЦР

1. Длительность.
2. Высокий риск контаминации.
3. Высокие затраты при массовых анализах.
4. Ядовитые реагенты (*EtBr*).
5. ТРУДОЕМКОСТЬ



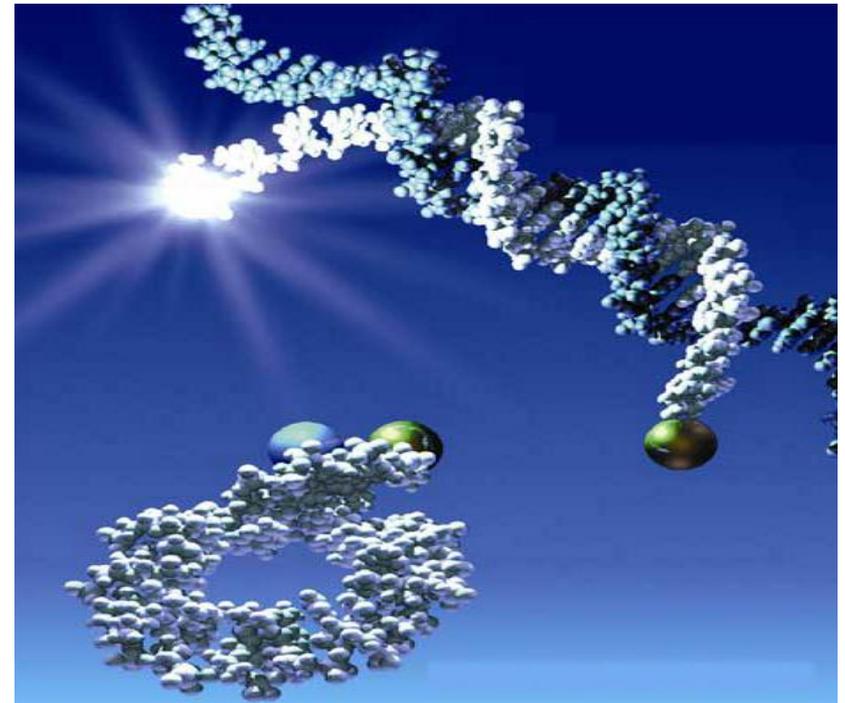
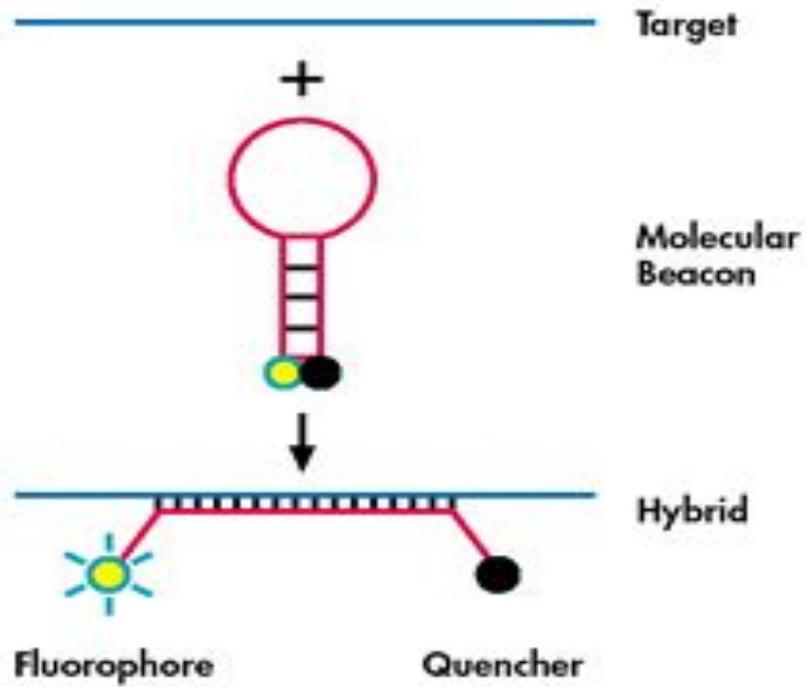
ПЦР в реальном времени

1. Молекулярные бекконы – структура шпильки.
 2. TaqMan-зонды – линейные зонды (Roche Diagnostics).
 3. «Скорпион»-зонды – структура шпильки и билинейная (Invitrogen).
-

Молекулярный бекон (Molecular Beacon).



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БЕКОНЫ



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БЕКОНЫ

1) Denaturation

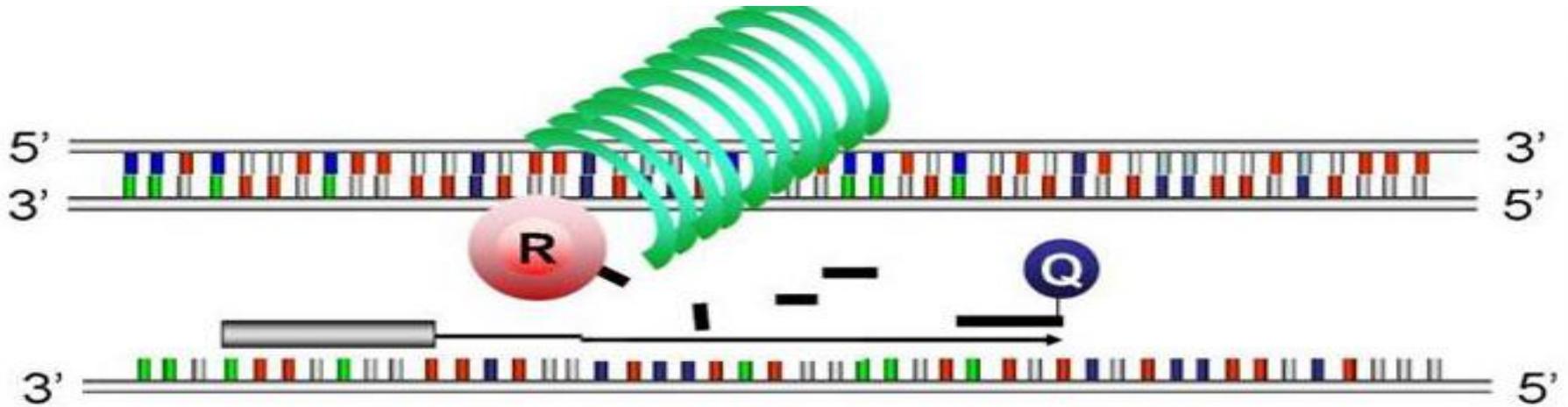


2) Hybridization

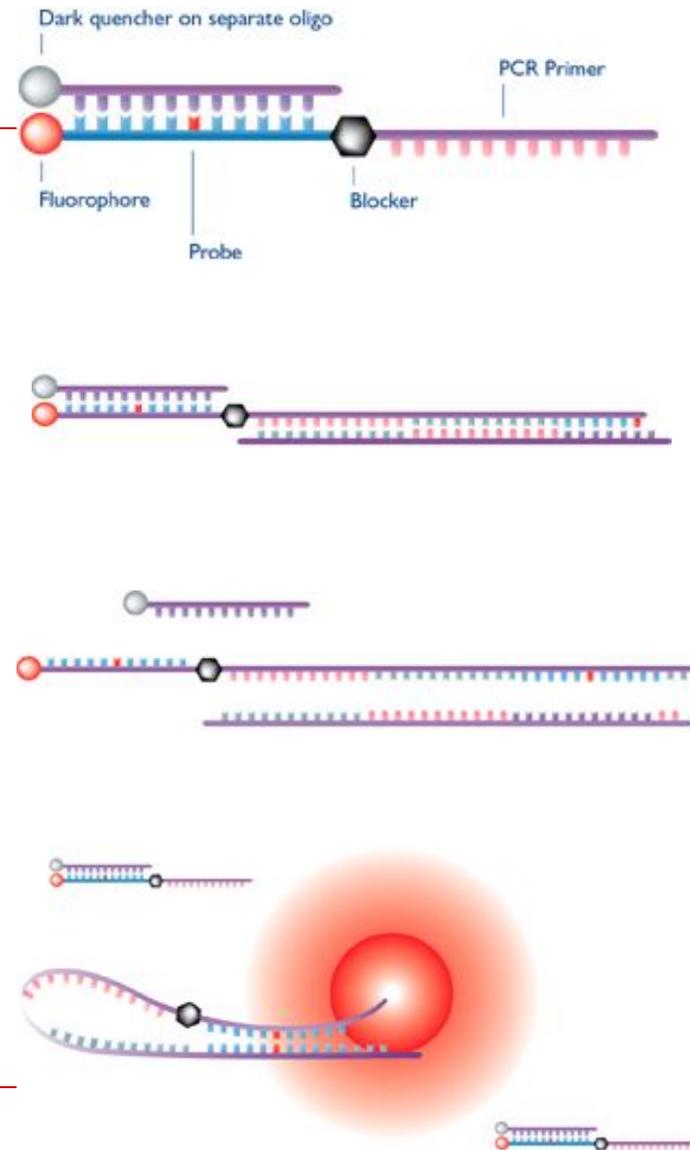
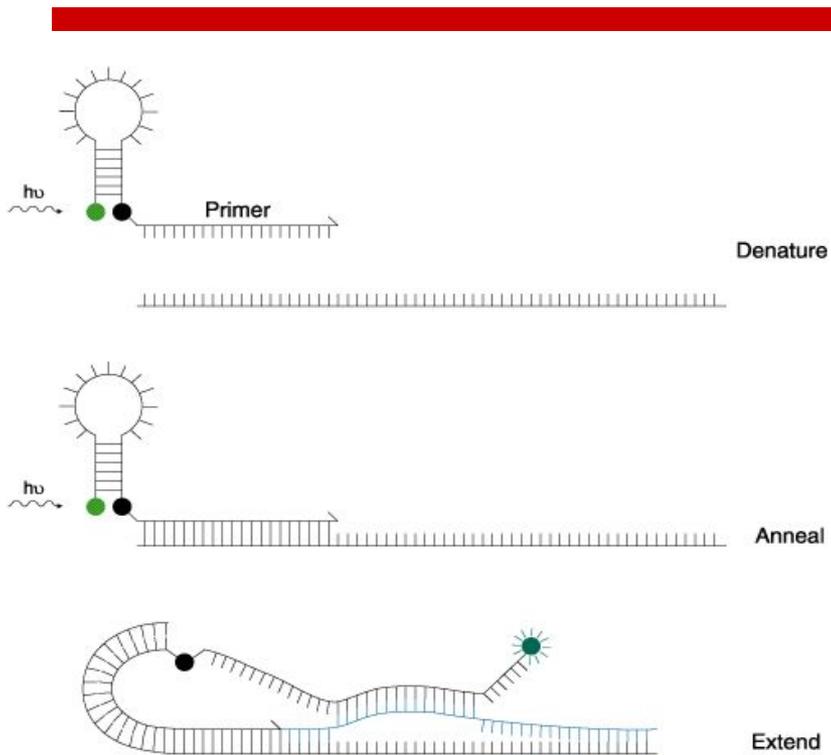


ТaqMan-зонд - в процессе проведения ПЦР происходит освобождение флуоресцентной метки

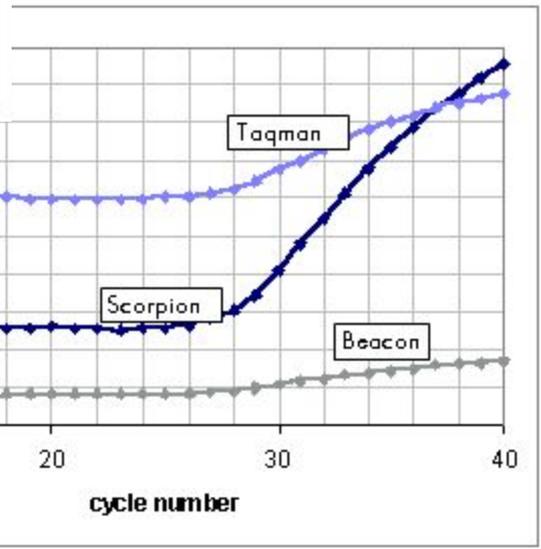
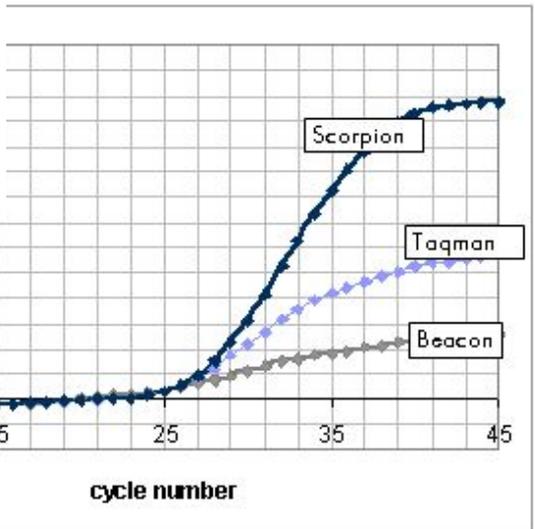
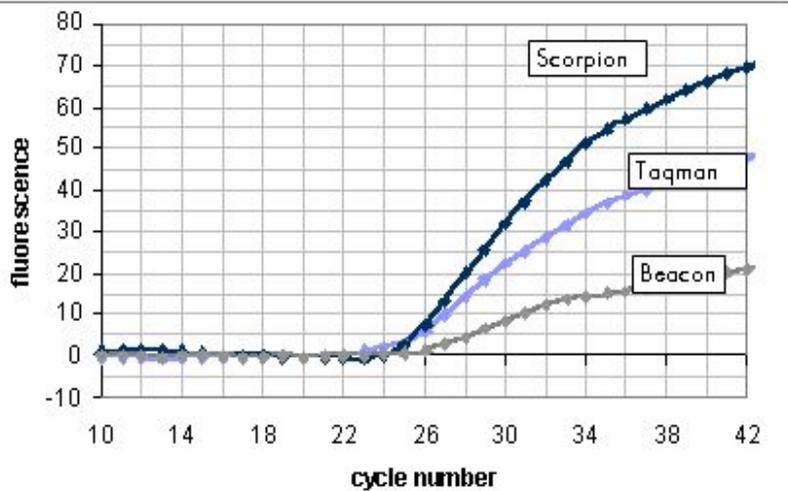
ДНК-зонд при амплификации ДНК-полимеразой последовательно флуоресцирует



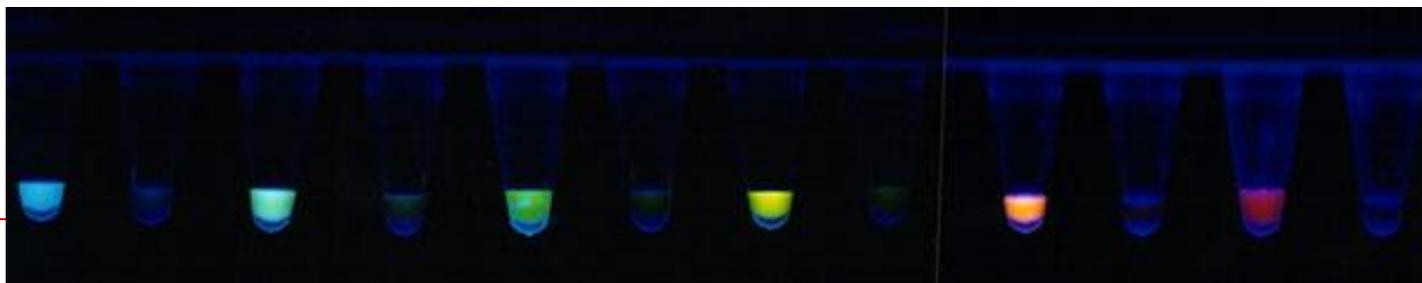
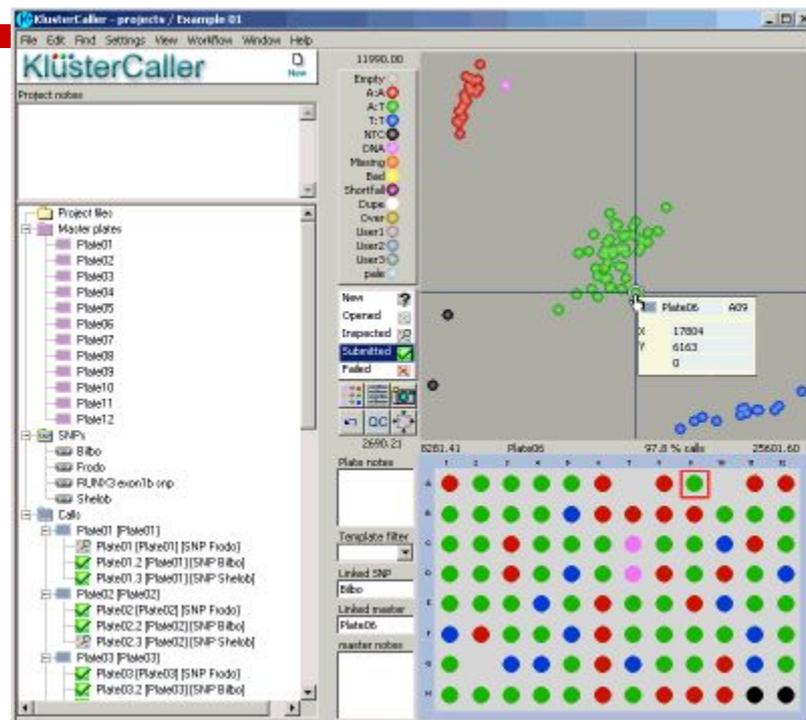
«СКОРПИОН»-ЗОНДЫ



Сравнение технологий



Используя разные флуоресцентные метки можно детектировать в пробирке разные ПЦР продукты



Детекция флюоресценции



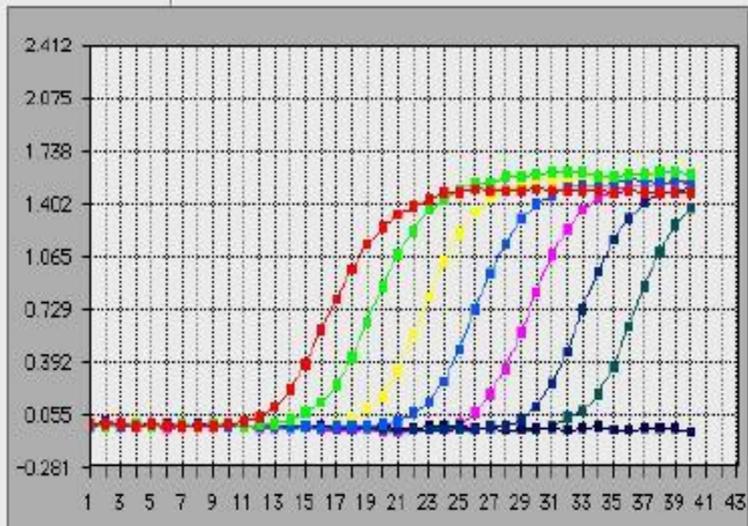
Детекция в режиме
реального времени
(Real-time PCR)



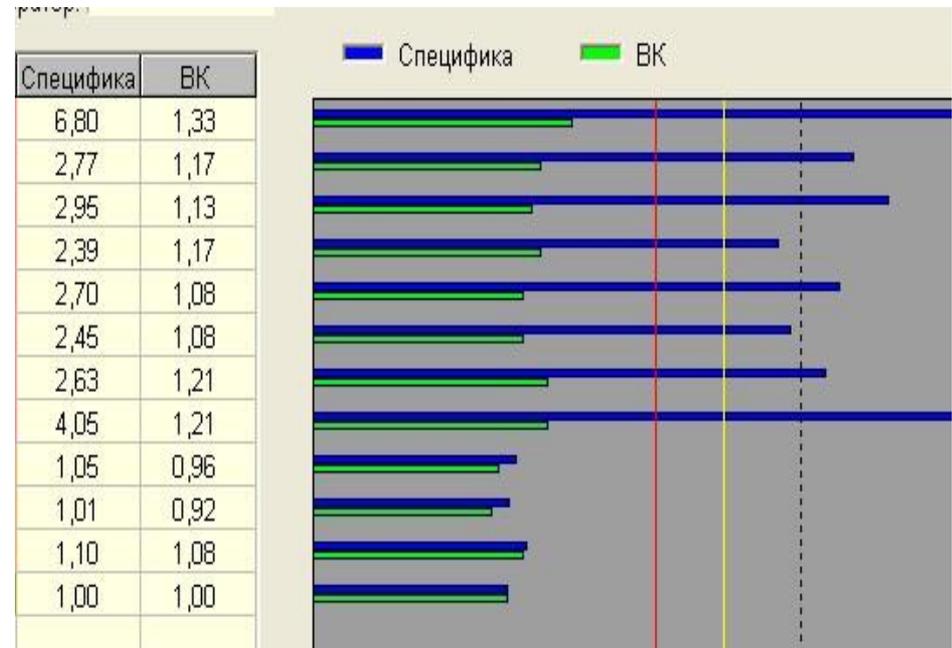
Детекция после ПЦР
(end-point detection)

Детекция флюоресценции

Real-time PCR



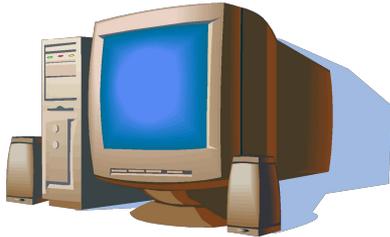
End-point detection



Преимущества ПЦР в реальном времени:



- все операции проводятся в одной пробирке;
- исключается риск контаминации ПЦР-смеси и продуктов;



- быстрота анализа;
- возможность автоматизации;



- экономия затрат времени и труда.
-

Преимущества ПЦР в реальном времени:

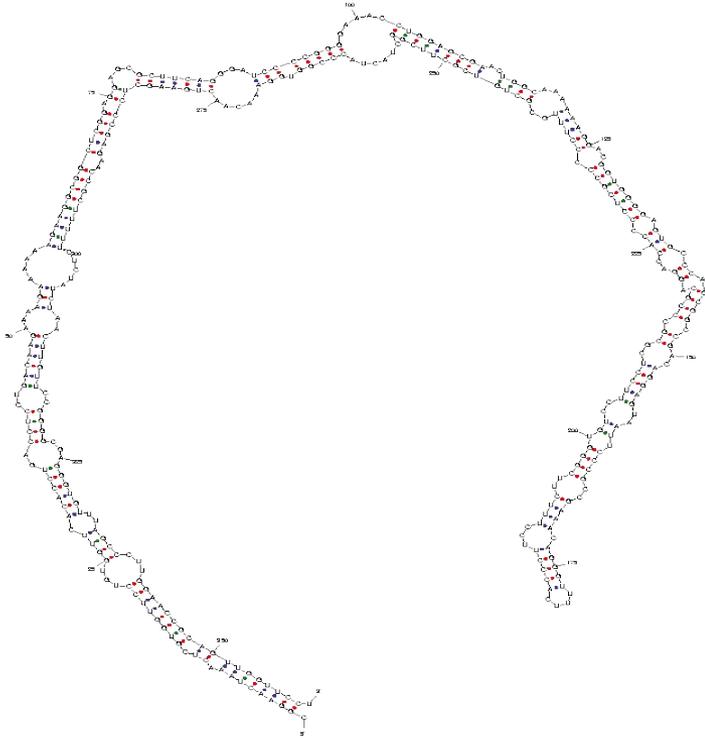
- Чувствительность
 - В 10000 раз более чувствительнее чем ELISA
 - В 100 раз более чувствительнее чем обычный ПЦР
-

Детекция вириода веретеновидности клубней картофеля PSTVd



Детекция вириода веретеновидности клубней картофеля PSTVd

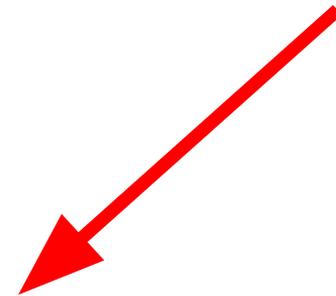
РНК



ОТ-ПЦР



кДНК



Real-time PCR

ИЛИ

End-point detection

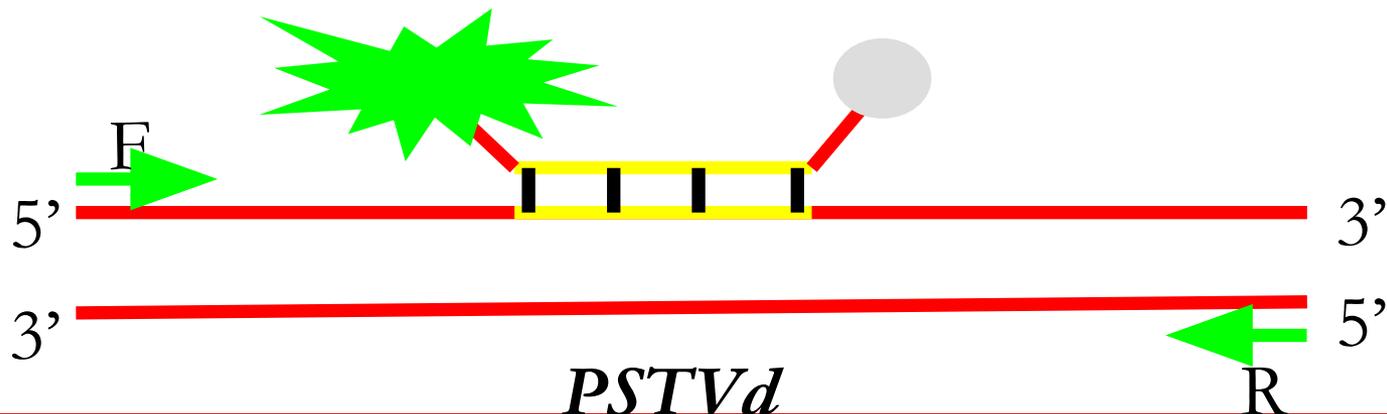
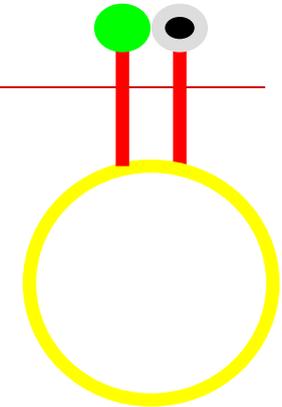
Детекция картофельного вирида PSTVd

```

*      100      *      120      *      140      *      160      *
PSTVS : agggatccccgggaaacctggagcgaactggcaaaaaaggacggtggggagtgccagcggccgacaggagtaattcccgcga : 170
PSTVF : agggatccccgggaaacctggagcgaactggcaaaaaaggacggtggggagtgccagcggccgacaggagtaattcccgcga : 168
AY937194 : agggatccccgggaaacctggagcgaactggcaaaaaaggacggtggggagtgccagcggccgacaggagtaattcccgcga : 169
          AGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAAaAAaGGACGGTGGGGAGTGCCcAGCGGCCGACAGGAGTAATTCcCGCCGA

      180      *      200      *      220      *      240      *
PSTVS : aacagggttttcacccttcctttctcgggttccttctcgcgccgcaggaccaccctcggcccctttgcgctgtcgctccg : 255
PSTVF : aacagggttttcacccttcctttctcgggttccttctcgcgccgcaggaccaccctcggcccctttgcgctgtcgctccg : 253
AY937194 : aacagggttttcacccttcctttctcgggttccttctcgcgccgcaggaccaccctcggcccctttgcgctgtcgctccg : 254
          AACAGGGTTTTACCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCTTCTCGCGCCCGCAGGACCACCCTCGCCCCCTTTGGGCTGTCGCTTCG

      260      *      280      *      300      *      320      *      340
PSTVS : gctactaccgggtggaacaaactgaagctcccgagaaccgctttttctctatct-atttgcttcggggcgagggtgttagccc : 339
PSTVF : gctactaccgggtggaacaaactgaagctcccgagaaccgctttttctctatcttgattgcttc-ggggcgagggtgttagccc : 337
AY937194 : gctactaccgggtggaacaaactgaagctcccgagaaccgctttttctctatcttacttgcttc-ggggcgagggtgttagccc : 338
          GCTACTACCGGTGGAAACAACCTGAAGCTCCCGAGAACCgCTTTTTCTCTATCTta TTGCTTC GGGGCGAGGGTGTtAgCCC
    
```



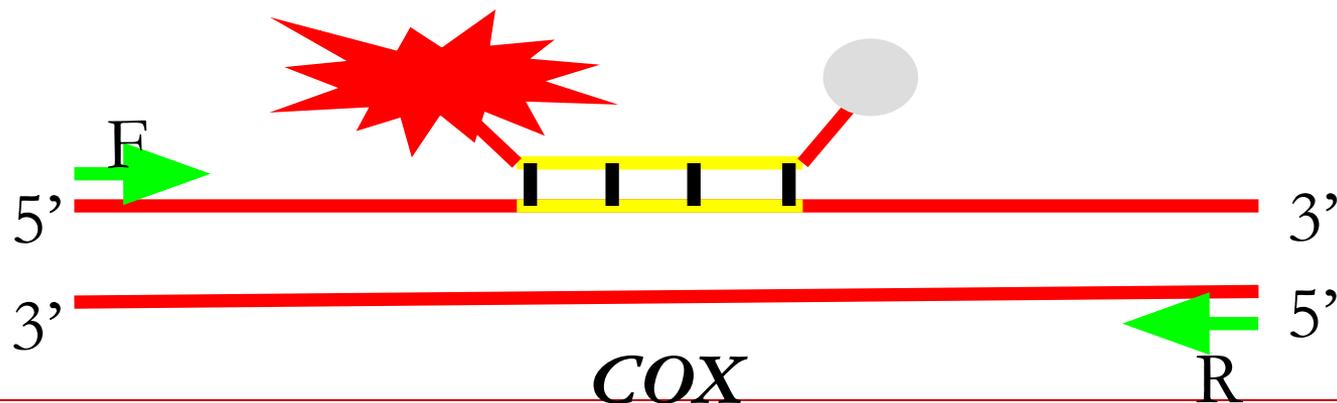
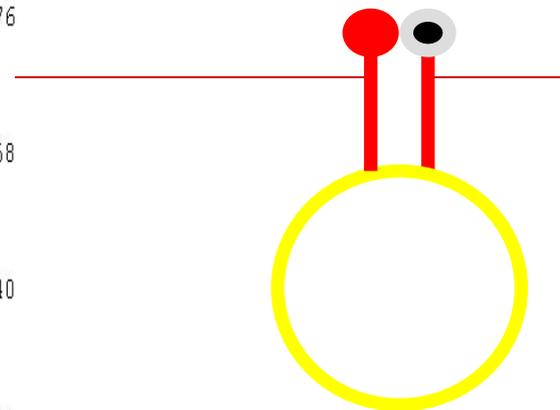
Детекция картофельного вируса PSTVd

```
1400      *      1420      *      1440      *      1460      *
MISTCOX1 : gaaacttttaggtcaaaccatttttgatcaccttttcggggttaatatgaccttctttcctatgcatttcttagggcttt : 1476
          GAAACTTTAGGTCAAATCCATTTTGGATCACCTTTTCGGGGTTAATATGACCTTCCTTCCTATGCATTTCTTAGGGCTTT

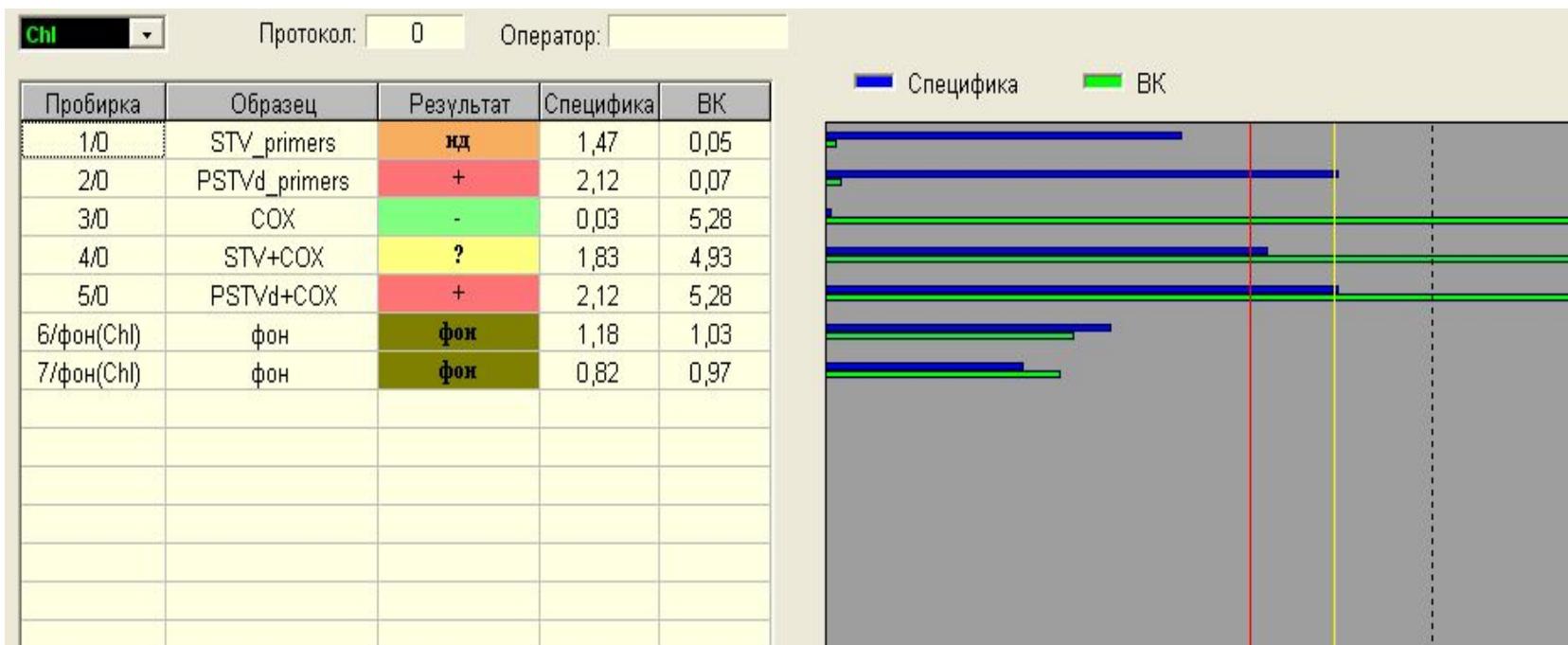
1480      *      1500      *      1520      *      1540      *      15
MISTCOX1 : cgggtatgccacgtcgcatteccagattatccagatccttacgctggatggaatgcccttagcagttttggctcttatataatc : 1558
          CGGGTATGCCACGTCGCATTCAGATTATCCAGATGCTTACGCTGGATGGAATGCCCTTAGCAGTTTGGCTCTTATATATC

60      *      1580      *      1600      *      1620      *      1640
MISTCOX1 : cgtagttgggattgtcgtttcttcgctggtcgtaaccaatcacttcaagcagtggaagaacaaaagatgtgctccaagtcct : 1640
          CGTAGTTGGGATTTGTCGTTTCTCGTGGTCGTAACAATCACTTCAAGCAGTGGAAAGAACAAAAGATGTGCTCCAAGTCCT

      *      1660      *      1680      *      1700      *      1720
MISTCOX1 : tgggctggtgaacagaatccaaccacaccggaatggatggtacaaagtcctccagcttttcatacttttgagaacttccag : 1722
          TGGGCTGTTGAACAGAATCCAACCACACCggaatggatggtacaaagtcctccagcttttcatacttttgagaacttccag
```

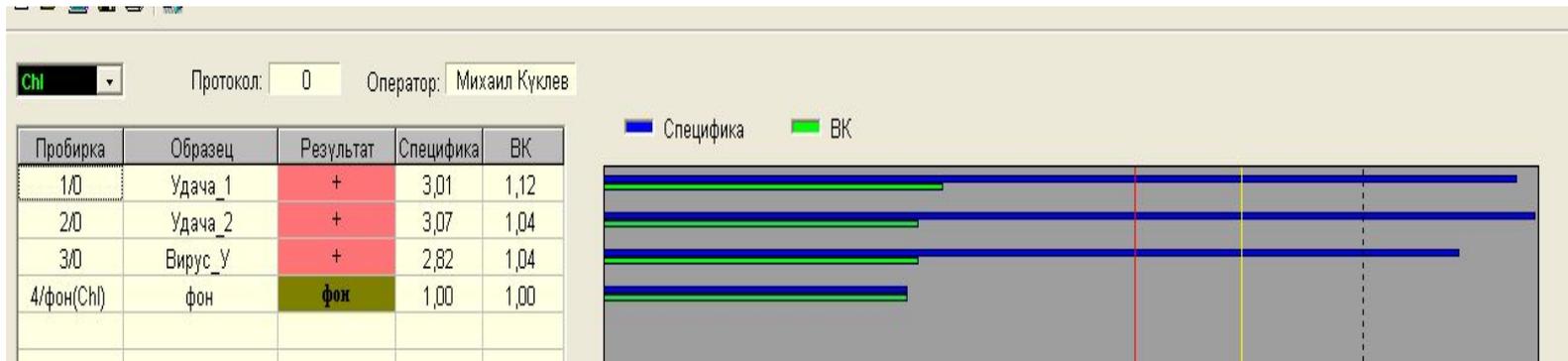


Детекция картофельного вирида PSTVd

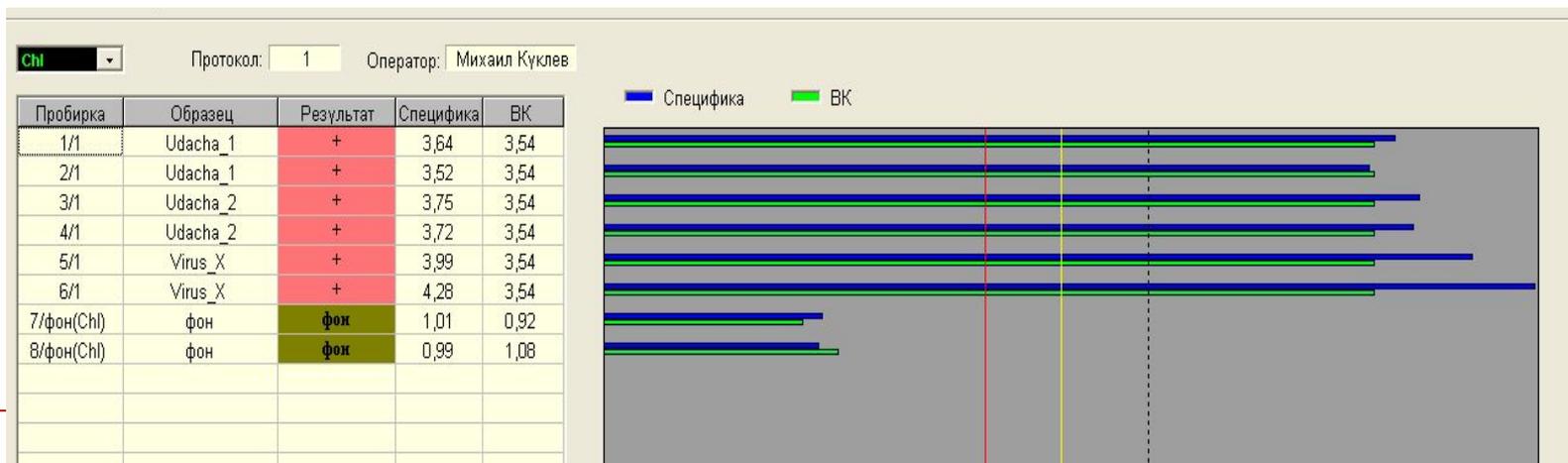


Детекция вирусов X и Y картофеля

Детекция вируса Y



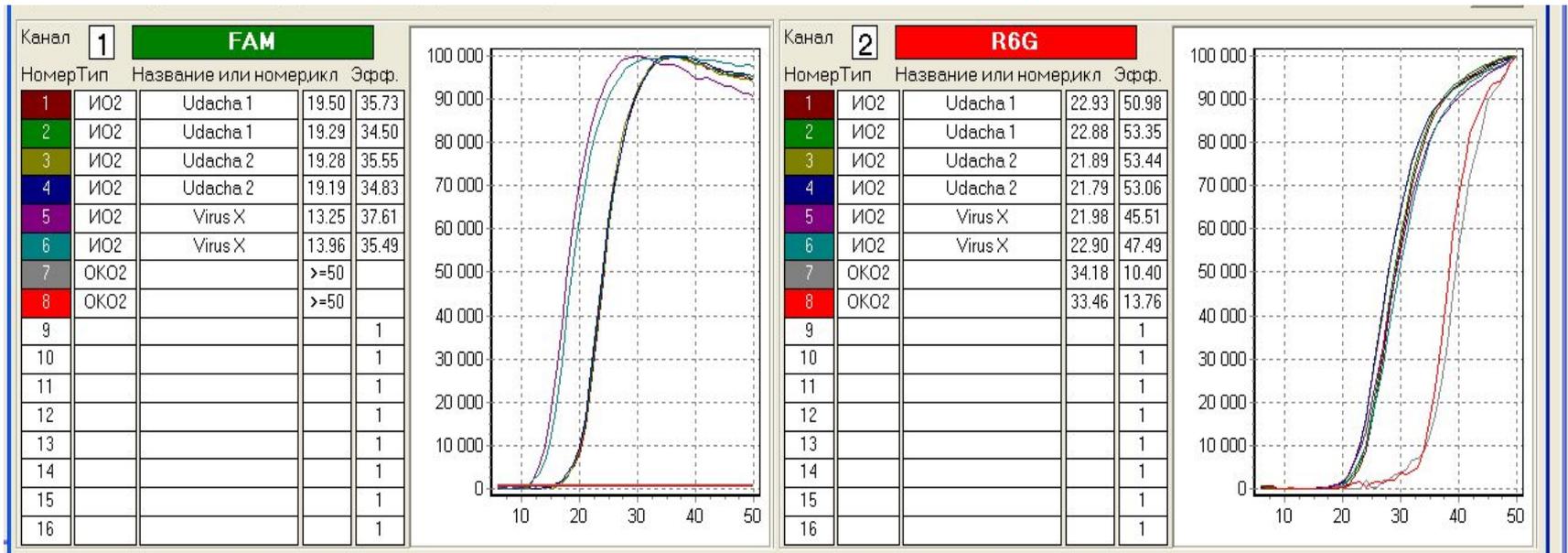
Детекция вируса X



Детекция вирусов картофеля

Сокращение времени детекции в 2 раза

Детекция вируса X картофеля с помощью Real-time ПЦР



Диагностикумы



□ **Картофель:** Вирусы X и Y, вирус скручивания листьев картофеля, вириод веретеновидности клубней картофеля

□ **Земляника:** вирус кольцевого пожелтения жилок листа, вирус крапчатости листьев, вирус слабого краевого пожелтения листа, вирус морщинистости листьев земляники, микоплазмы;

□ **Огурец:** Вирус огуречной мозаики, вирус зеленой крапчатой мозаики.



Возможность использования в полевых условиях

Cepheid Smart Cycler[®]



Возможность использования в полевых условиях

□ Экстракция ДНК

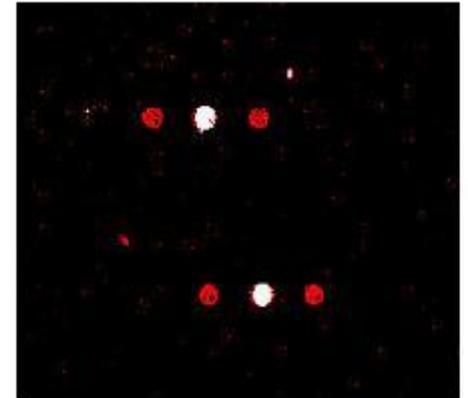


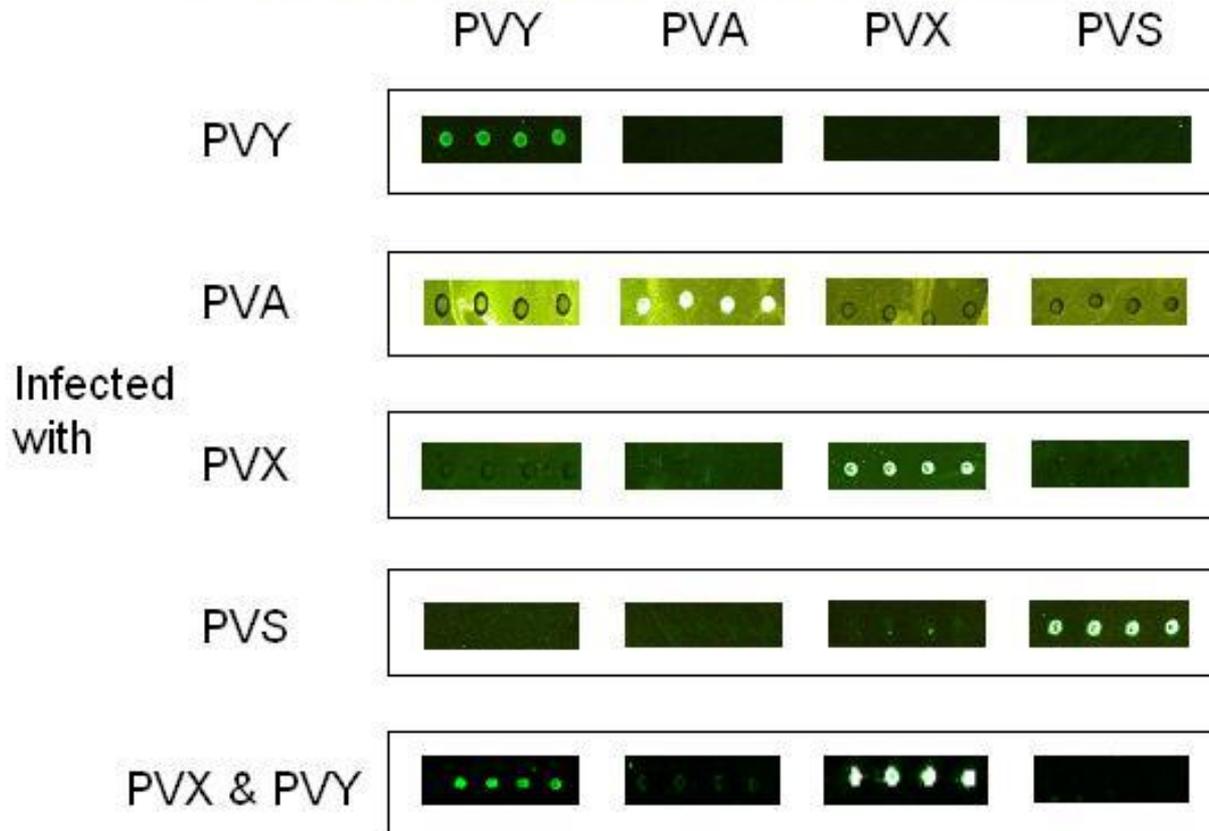
□ ПЦР



Биочипы

- Возможность одновременно детекции более 30000 мишеней





Центр молекулярной биотехнологии

