

УДК 577.29

EDN [SYAIXG](#)



<https://www.doi.org/10.47813/rosnio-II.2023.8.263-266>

Экспериментальный подход для диагностики церкоспороза сои с использованием RPA+CRISPR/Cas12a

П.Д. Тимкин*, А.А. Пензин

ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои»,
г. Благовещенск, Россия

*E-mail: tpd@vniisoi.ru

Аннотация. В статье демонстрируются перспективы использования нового экспериментального подхода для детекции грибка *Cercospora Sojina* Hara. Основной принцип лежащий в представленном методе – это комбинация двух технологий: RPA (Recombinase polymerase amplification) и CRISPR/Cas12a. RPA – представляет из себя альтернативу классической ПЦР, с особенностями в виде более быстрой скорости протекания реакции и её прохождения в изотермических условиях. Использование технологии RPA позволит сократить амплификацию до 15-30 минут. Амплифицированную геномную ДНК можно будет детектировать меченным флуоресцентной меткой CRISPR/Cas12a. Сложности такого метода лежат в подборе специфичных праймеров и подборе внутри ампликона спейсеров для гидовой-РНК. В результате проведенной работы удалось с использованием плагина primer3 на платформе Unipro Ugene подобрать специфичную пару праймеров, которая позволит идентифицировать именно этот фитопатоген. Спейсер для генома был идентифицирован в веб-инструментарии Chop-Chop. Полученные пара праймеров и спейсер имеющий комплиментарность исключительно к локусу CP036215 у *Cercospora Sojina* H.

Ключевые слова: RPA, CRISPR/Cas12a, *Cercospora Sojina* Hara, диагностика фитопатогенов.

An experimental approach for diagnosing cercosporosis using RPA+CRISPR/Cas12a

P.D. Timkin*, A.A. Penzin

Federal State Budget Scientific Institution Federal Research Center "All-Russian Scientific Research Institute of Soybean", Blagoveshchensk, Russia

*E-mail: tpd@vniisoi.ru

Abstract. The article demonstrates the prospects for using a new experimental approach for the detection of the fungus *Cercospora Sojina* Hara. The main principle underlying the presented method is a combination of two technologies: RPA (Recombinase polymerase amplification) and CRISPR/Cas12a. RPA - is an alternative to classical PCR, with features in the form of a faster reaction rate and its passage under isothermal conditions. Using RPA technology will reduce amplification to 15-30 minutes. Amplified genomic DNA can be detected fluorescently labeled with CRISPR/Cas12a. The difficulties of this method lie in the selection of specific primers and the selection of spacers for the guide RNA within the amplicon. As a result of the work carried out, using the primer3 plugin on the Unipro Ugene platform, it was possible to select a specific pair of primers that would make it possible to identify this particular phytopathogen. The genome spacer was identified in the Chop-Chop web toolkit. The resulting primer pair and spacer having complementarity exclusively to the CP036215 locus in *Cercospora Sojina* H.

Keywords: RPA, CRISPR/Cas12a, *Cercospora Sojina* Hara, diagnostics of phytopathogens.

1. Введение

Cercospora sojina Н. – фитопатоген, узкоспециализированный возбудитель заболевания – церкоспороз сои, распространенного как на диких, так и на окультуренных сортах. В результате жизнедеятельности патогена семядоли покрываются коричневыми язвами с темно-бурым окаймлением и грязно-серым налетом. На листьях и других надземных органах растения также появляются характерные для заболевания симптомы. Церкоспороз сои способен снижать урожайность в 2-3 раза, тем самым нанося ущерб сельхозпроизводителям и ставя под угрозу продовольственную безопасность России [1]. Ввиду распространенности данного фитопатогена в регионе юго-восточной азии и Дальнего востока России, имеется необходимость в быстрой детекции данного возбудителя для сокращения потери урожайности от церкоспороза. Решением этой проблемы могут послужить экспресс диагностические тесты на основе RPA и CRISPR/Cas12a. RPA – альтернативный метод кратного удвоения геномной ДНК без использования амплификатора. В отличие от классической ПЦР, где отжиг праймеров и элонгация происходит под действием температурного фактора, в RPA данные процессы катализируются с участием фермента рекомбиназы, SSB-белков и специальной ДНК – полимеразы, которая способна сохранять активность в изотермических условиях. CRISPR/Cas12a – современная система позволяющая с помощью гидовой-РНК находить специфичный участок гена и при взаимодействии с ним производить его деградацию. С присоединённой флуоресцентной меткой к такой системе можно добиться эффекта свечения после удачной амплификации, что будет свидетельствовать о наличии фитопатогена в образце.

2. Материалы

Для успешного дизайна праймеров была импортирована последняя геномная сборка *Cercospora Sojina* Н. в базе данных NCBI. На данной сборке была выбрана первая хромосома как шаблон для создания праймеров на платформе Unipro Ugene [2]. Подбор праймеров осуществлялся с помощью плагина Primer3 при стандартных настройках [3]. Валидация полученных олигонуклеотидов на возможность образования вторичных структур и димеров проходила на сервере Oligoanalyzer. Полученный в результате проведения пцр – *in silico* ампликон использовался как шаблон в сервере Chop-Chop для нахождения удачного спейсера [4]. Финальной проверкой являлась перекрестная проверка праймеров и спейсеров на видоспецифичность по BLAST – алгоритму.

3. Результаты и обсуждения

В результате проведенного протокола удалось получить пару видоспецифичных праймеров (таблица 1). Минимальная энергия связывания у прямого и обратного праймера составляет больше -9 kcal/mol, что является рекомендацией при дизайне подобных олигонуклеотидов, данная характеристика показывает низкую вероятность образования гомо и гетеродимеров в реакционной смеси, о чем также свидетельствуют спрогнозированные температуры плавления ниже температурного оптимума $37-42$ °C.

Таблица 1. Пары праймеров и их характеристика.

	Праймеры	Гомодимеры	Гетеродимеры	Шпильки
Forward	5' TCGAGTTCAGTTGGGG ATAGTGGTTAGGGG 3'	(-6.76 kcal/mol)		Tm 9.6 (0.97 kcal/mol)
Reverse	5' CGACCACCCTGACGGA GACCTCTTTGTTTAA CG 3'	(-4.85 kcal/mol)	(-7.74 kcal/mol)	Tm 36.3 (-1.43 kcal/mol)

Веб – инструментарий Chor-chor на основании длинны спейсера в 25 нуклеотидов и наличия рам-мотива: «TTTN», вывел результаты в количестве 8 предполагаемых спейсеров, сортировку и проверку по специфичности в пределах ампликона прошли 5 олигонуклеотидов (таблица 2). На основании BLAST – алгоритма, была подтверждена видовая специфичность по локусу CP036215 в первой паре хромосомы на геномной сборке RACE15 [5].

Таблица 2. Полученные спейсеры.

№	Спейсеры	Цепь	Специфичность
1	TTTAATCCAGCCGAG TCCGCTCCGTGGG	+	<i>Cercospora sojina</i>
2	TTTCTCAACGACAGG TTGAGTTTTTAAT	+	<i>Cercospora sojina</i>
3	TTTAGGCCCCCCAC GGCCGGATGCTTT	-	<i>Cercospora sojina</i>
4	TTTACGGCCATCCCA GGGCCAGGTGAAC	-	<i>Cercospora sojina</i>
5	TTTAGGCCCCCCCAT GGCCGGATGCTTT	-	<i>Cercospora sojina</i>

4. Заключение

В ходе работы над дизайном диагностических олигонуклеотидов, были получены пара праймеров и спейсеры, которые можно будет использовать для экспресс-диагностики церкоспороза. Однако предложенные олигонуклеотиды необходимо проверить в лабораторных условиях на возможность использования их в диагностических наборах.

Список литературы

1. Пересыпкин В.Ф. Болезни сельскохозяйственных культур. Том 1. / В.Ф. Пересыпкин. Болезни зерновых и зернобобовых культур. – Киев: Урожай, 1989. – 216 с.
2. Okonechnikov K. The UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // *Bioinformatics*. – 2012. – № 28. – P. 1166-1167. <https://www.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
3. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* – 2012. – 40(15):e115. <https://www.doi.org/10.1093/nar/gks596>. Epub 2012 Jun 22. PMID: 22730293; PMCID: PMC3424584.
4. Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., Valen, E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research* (2019).
5. Gu X., Ding J., Liu W. et al. Comparative genomics and association analysis identifies virulence genes of *Cercospora soja* in soybean. *BMC Genomics*. – 2020. – 21. – 172. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6581-5>