

DOLGOTRAJNA STABILNOST PREDPRIPRAVLJENIH REAGENTOV OMOGOČA POENOSTAVITEV IZVEDBE IZOTERMNE REAKCIJE LAMP ZA ZAZNAVANJE BOLEZNI RASTLIN NA TERENU

Neža TURNŠEK¹, Špela ALIČ², Tanja DREO³

¹⁻³Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

IZVLEČEK

533

Izotermna amplifikacija (LAMP) za testiranje rastlinskih bolezni na kraju samem je zaradi svoje praktičnosti vse bolj priznana. Čeprav je testiranje LAMP uporabniku prijazno in primerno za grobe materiale, priprava reagentov in kontrol brez kontaminacije ostaja izziv, zlasti v terenskih razmerah. Ta postopek tradicionalno zahteva dodatne korake in opremo. V projektu Q-Entry (V4-2023) smo želeli poenostaviti testiranje na terenu in zmanjšati tveganje kontaminacije z izvedbo celovite študije stabilnosti vnaprej pripravljenih oligonukleotidov in pozitivnih kontrolnih materialov za test LAMP, za zaznavanje bakterij *Ralstonia* spp. Ta študija temelji na našem predhodno razvitem standardiziranem protokolu (Lenarčič *in sod.*, 2014; Pirc *in sod.*, 2021). Vnaprej smo pripravili mešanico šestih oligonukleotidnih začetnikov in kontrolno DNK znanega izolata *R. solanacearum* ter jih razporedili v testne trakove. V obdobju dveh let smo te materiale testirali vsake tri mesece, pri čemer smo predhodno pripravljenim mešanicom dodali 2x Isothermal Master Mix (OptiGene) in reakcije izvajali pri konstantni temperaturi 60°C z instrumentom Genie II® (OptiGene). Rezultate smo ovrednotili s primerjavo kvalitativnih rezultatov in časa do pozitivne reakcije v različnih časovnih intervalih z začetnimi ugotovitvami. Naši rezultati potrjujejo stabilnost predhodno pripravljenih reagentov in kontrolnega materiala za najmanj dve leti, če so shranjeni pri temperaturi ≤ -15 °C. Ta stabilnost omogoča njihovo predhodno pripravo, s čimer se učinkovito ločijo naloge, za katere sta koristna nadzorovano okolje in specializirana oprema (za delo z majhnimi volumni), od dejanskega izvajanja testov na terenu. Zato ta pristop poenostavi postopke, saj zmanjša število potrebnih korakov na kraju samem, s tem pa poveča praktičnost diagnostike rastlinskih bolezni na terenu.

Ključne besede: LAMP, testiranje na terenu, *Ralstonia* spp., dolgoročna stabilnost vzorcev in reagentov

¹ mag., Večna pot 121, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, e pošta: neza.turnsek@nib.si

² dr., prav tam

³ dr. biotehn. zn., prav tam

ABSTRACT

ENHANCING FIELD EFFICIENCY OF ISOTHERMAL LAMP: STABILITY OF PREMIXED TEST REAGENTS FOR ADVANCED PREPARATION AND STREAMLINED PEST IDENTIFICATION

The adoption of isothermal Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for on-site testing of plant diseases is increasingly recognized for its practicality. Although LAMP testing is user-friendly and accommodates crude sample materials, preparing reagents and controls without contamination remains a challenge, especially in field conditions. This process traditionally requires additional steps and equipment, posing operational complexities. In the Q-Entry project (V4-2023), we aimed to simplify field testing and reduce contamination risks by conducting a comprehensive stability study of premixed oligonucleotides and positive control materials for the LAMP test targeting *Ralstonia* spp. This study builds upon our standardized protocol previously developed (Lenarčič *et al.*, 2014; Pirc *et al.*, 2021). We prepared a blend of six LAMP oligonucleotide primers and control DNA from a known *R. solanacearum* isolate in advance, arranging them into testing strips. Over a two-year period, we tested these materials every three months, adding 2x Isothermal Master Mix (OptiGene) to the premixed primers, and conducting reactions at a constant temperature of 60°C using a Genie II® instrument (OptiGene). We evaluated the results by comparing the qualitative outcomes and the time to positivity at various intervals with the initial findings. Our results affirm the stability of both premixed reagents and control material for a minimum of two years when stored at temperatures ≤ -15 °C. This stability enables their advance preparation, effectively segregating tasks that benefit from a controlled environment and specialized equipment (for handling small volumes) from the actual test execution in the field. Consequently, this approach simplifies field operations by reducing the number of steps required on-site, thereby enhancing the efficiency and reliability of plant disease diagnostics.

Key words: LAMP, field testing, *Ralstonia* spp., long-term stability of samples and reagents

1 UVOD

Tehnologija zankastega izotermičnega pomnoževanja odsekov DNA (LAMP, angl. "Loop-Mediated Isothermal Amplification") se je izkazala kot obetavno diagnostično orodje. Je hitra, občutljiva in stroškovno ugodna tehnologija. Pred širšo uporabo tehnologije LAMP na določenem področju je posebnega pomena ocena njegove izvedljivosti, ovrednotenje njegovega delovanja in stabilnosti reagentov v terenskih razmerah, ter prepoznavanje kritičnih točk uporabe. V študiji smo analizirali celoten proces izvedbe testa LAMP na izbranem primeru ter na podlagi analize rezultatov preverili poenostavljeno izvedbo z uporabo pred-pripravljenih reagentov in kontrolnih materialov. Študijo smo izvedli na testu LAMP za določanje bakterij kompleksa vrst *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi *et al.*, 1996 emend. Safni *et al.*, 2014 (Lenarčič *in sod.*, 2014; Pirc *in sod.*, 2021), ki je vključen v mednarodne standarde (Izvedbena uredba Komisije (EU) 2022/1193; PM 7/21 (3)) za določanje teh bakterij v rastlinah in gomoljih z bolezenskimi znamenji. Bakterije kompleksa vrst *Ralstonia*

solanacearum povzročajo venenje in venenju sorodna bolezenska znamenja na več kot 200 različnih rastlinskih vrstah, med drugim tudi rjavo gnilobo krompirja.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Predpriprava reagentov in kontrolnih materialov

Dolgoročno študijo stabilnosti reagentov in kontrolnih materialov potrebnih za izvedbo testa LAMP smo izvedli na primeru testa LAMP za določanje bakterij kompleksa vrst *Ralstonia solanacearum* (Lenarčič *in sod.*, 2014) pri čemer smo pri izvedbi upoštevali naš predhodno razvit standardiziran protokol (Pirc *in sod.*, 2021).

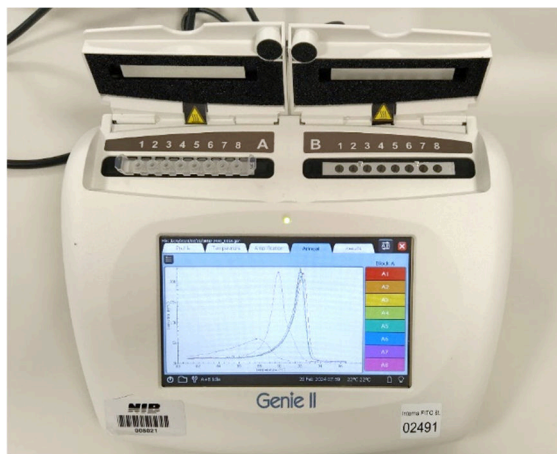
Poizkus testiranja stabilnosti reagentov smo izvajali 24 mesecev, v enakomernih časovnih intervalih (testiranje na 3 mesece). Študijo smo izvedli na delovni obliki reagentov, ki smo jih pripravili vnaprej. Pred-pripravljena mešanica je vsebovala vse potrebne oligonukleotidne začetnike v delovnih koncentracijah (F3_RS_egl, B3_RS_egl, FIP_RS_egl, BIP_RS_egl, FLoop_RS_egl in BLoop_RS_egl) ter molekularno vodo. Mešanico smo alikvotirali v testne trakove (10 μ L/posamezno reakcijo). Do posamezne točke analize smo v skladu z navodili proizvajalca mešanico hranili zamrznjeno (≤ -15 °C). Pred analizo smo mešanico odmrznili in ji dodali Master Mix (Isothermal Master Mix MM ISO-001, OptiGene, Velika Britanija).

V sklop testiranja stabilnostne študije smo vključili tudi preverjanje najprimernejše oblike shranjevanja kontrolnih materialov. Za pripravo kontrolnih materialov (pozitivne kontrole) testiranje smo izbrali DNA bakterije *Ralstonia solanacearum* NCPPB 4156 (NIB Z 30), ki jo tudi sicer uporabljamo kot pozitivno kontrolo molekularnih testov za določanje *Ralstonia solanacearum*. Delovno obliko kontrolnih materialov smo pripravili tako, da smo DNA izolirano iz bakterijske suspenzije (uporabljen komplet QuickPick Plant Kit, Bionobile) do ustrezne koncentracije redčili v pufru Tris-EDTA (TE) brez ali z dodatkom eksterne DNA netaarčnega organizma (DNA spermijev lososa). Kontrolne materiale smo do posamezne točke analize hranili zamrznjene (≤ -15 °C).

2.2 Izvedba testa LAMP

Testiranje v časovni točki 0 je bilo izvedeno takoj po pripravi reagentov in kontrolnih materialov. Rezultati testa LAMP v tej točki predstavljajo izhodišče za primerjavo rezultatov vseh nadaljnjih meritev. Test LAMP smo nato izvedli še v časovnih točkah 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 in 24 mesecev po začetku študije kar časovno skupno obsega 2 leti testiranja stabilnosti. V vsaki časovni točki smo izvedli meritve posamezne oblike DNA (DNA v TE in DNA v ssTE pufru; to je bil kontrolni material) v 3 tehničnih ponovitvah (reakcijah) in negativno kontrolo (NTC; voda za molekularno biologijo) v 2 tehničnih ponovitvah (reakcijah). V vseh časovnih točkah je bilo testiranje izvedeno na instrumentu Genie II[®] (OptiGene, Velika Britanija) (Slika 1), ki je prilagojen tudi za izvajanje testiranja LAMP na terenu. Pomnoževanju, ki je potekalo 30 min pri temperaturi 60 °C, je sledil korak določanja talilne krivulje DNA s postopnim spreminjanjem temperature od 98 °C do 80 °C v korakih po 0.05 °C/s. Test je bil veljaven, če so bili rezultati vseh vključenih kontrol ustrezni. Posamezne reakcije smo vrednotili glede na krivulje pomnoževanja, temperature talilnih krivulj (T_m) pomnožkov in časa pozitivnosti (T_p) t.j. časovna točka v reakciji pri kateri signal pomnoževanja preseže ozadje. Posamezno reakcijo smo interpretirali kot pozitiven rezultat, če smo opazili amplifikacijsko krivuljo, ki je presegla ozadje (smo določili čas pozitivnosti) in je bila

talilna temperature nastalega pomnožka med 91,1 in 92,3 °C. Rezultate smo dodatno obdelali s programom Genie Explorer v2.0.7.11 (OptiGene, Velika Britanija).



Slika 1: Aparatura za izvajanje testa LAMP, Genie II® (OptiGene, Velika Britanija) s testnim trakom v merilni enoti A (levo).

536

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Analiza kritičnih točk uporabe tehnologije LAMP na terenu

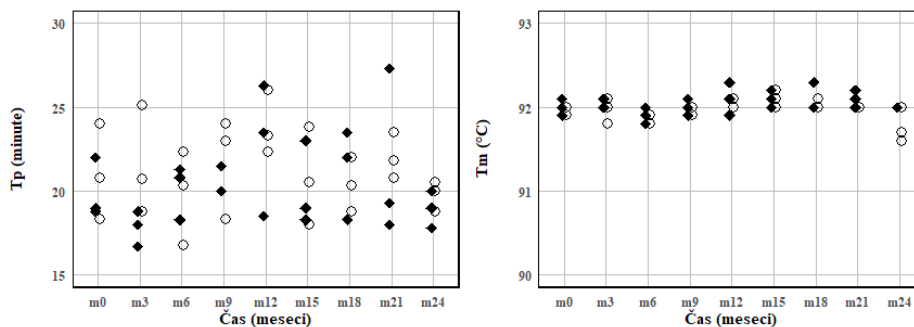
Uporaba tehnologije LAMP v laboratoriju ni zahtevna, saj so njegove kritične točke in tudi sam proces, enak drugim testom, ki temeljijo na molekularno bioloških metodah. Na terenu je zaželeno, da je število korakov čim manjše. Na ta način zmanjšamo občutljivost procesa za morebitne navzkrižne kontaminacije ter ga tudi poenostavimo. Z analizo procesa smo ugotovili, da bi s predpripravo reagentov lahko v precejšnji meri poenostavili izvedbo testov LAMP, tako v smislu števila korakov, potrebnega znanja pri izvajalcih, kot tudi v smislu potrebne opreme. Zato smo se v nadaljevanju osredotočili na pripravo pred-pripravljenih reagentov in kontrolnih materialov ter analizo njihove stabilnosti. S pred-pripravo mešanice oligonukleotidnih začetnikov se izognemo pipetiranju majhnih volumnov pod 10 µL (0,2 do 2,0 µL), ki zahtevajo ustrezne pipete in nadzorovano okolje (vlago in temperaturo).

3.2 Analiza stabilnosti pred-pripravljenih reagentov in kontrolnih materialov

V celotnem obdobju testiranja stabilnosti v devetih časovnih točkah v dveh letih nismo zaznali nobenih sprememb v stabilnosti reagentov, ki bi vplivale na kvalitativni rezultat reakcije. Vsi testi so bili veljavni, saj so bile ob izbranih pogojih analize vse negativne kontrole ustrezno negativne, medtem ko smo za vse tehnične ponovitve obeh kontrolnih materialov (DNK bakterije *R. solanacearum* z ali brez dodane eksterne DNK) v vseh

časovnih točkah dobili pozitiven rezultat. Pravilna interpretacija je bila mogoča tako na instrumentu Genie II® kot tudi znotraj računalniškega programa Genie Explorer s katerim smo opravili podrobnejše analize rezultatov. Zaključimo lahko, da so vnaprej pripravljene reagenti in kontrolni materiali dovolj stabilni vsaj 24 mesecev.

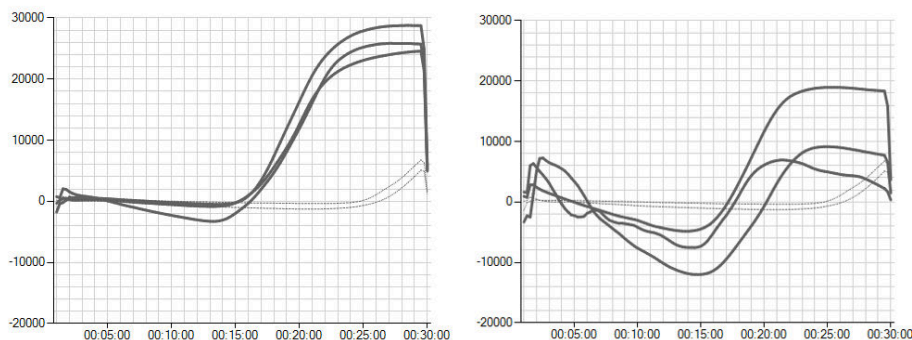
Čas pozitivnosti (Tp) je za oba tipa kontrolnih materialov nihal tako znotraj reakcije kot tudi med časovnimi točkami (Slika 2) in je segal od 16,8 do 26,0 minut (povprečen 21,19 minut s koeficientom variacije 11,2 %) za kontrolni material v pufru TE in od 16,7 do 27,3 minut (povprečen 20,37 minut s koeficientom variacije 12,8 %) za kontrolni material v pufru TE z dodano eksterno DNK. Relativno velika variabilnost v času pozitivnosti za enake koncentracije najverjetneje odraža efekt Monte Carlo, začetne majhne razlike v učinkovitosti pomnoževanja, ki se ob izredno hitrem pomnoževanju v reakciji LAMP nato potencirajo.



Slika 2: Rezultati testiranja stabilnosti pred-pripravljenih reagentov glede na rezultat časa pozitivnosti reakcije (Tp) in določene talilne temperature produkta (Tm). 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 karo).

V primerjavi z vrednostmi Tm določenimi v predhodnih študijah na instrumentu SmartCycler® (Cepheid, ZDA; Pirc *in sod.*, 2021), smo v tej študiji z uporabo instrumenta Genie II® (OptiGene, Velika Britanija) določili rahlo nižje vrednosti Tm in ustrezno prilagodili pogoje za pozitivni rezultat posamezne reakcije. Talilna temperatura (Tm) produktov pomnoževanja je bila bolj stabilna kot čas pozitivnosti in je preko vseh časovnih točk za kontrolne materiale segala od 91,6 do 92,3 °C (povprečno 92,0 °C s koeficientom variacije 0,14 %). Talilna temperatura tako v kombinaciji s časom pozitivnosti (Tp) ostaja zanesljiv pokazatelj specifičnega pomnoževanja in pomemben parameter za interpretacijo rezultatov.

Iz same oblike in višine amplifikacijskih krivulj po času lahko sklepamo, da je ustrežnejša priprava kontrolnih DNA v pufru TE brez dodatka DNA lososovih spermijev (Slika 3; Turnšek *in sod.*, 2024). Vzrok slabšim signalom v primeru dodatka DNA lososovih spermijev je najverjetneje počasna razgradnja te DNA in s tem večja možnost nespecifičnega pomnoževanja kratkih dvoverižnih DNA, ki jih barvilo za vizualizacijo vseh dvoverižnih DNA ne loči od tarčnih pomnožkov.



Slika 3: Primerjava amplifikacijskih krivulj (dviga fluorescence v odvisnosti od časa) za kontrolne materiale pripravljene v pufru TE (levo) in v pufru TE z dodatkom DNA lososovih spermijev (desno) po 24 mesecih. Prikazane krivulje pridobljene z instrumentom Genie II® (OptiGene) smo dodatno analizirali v programu Genie Explorer v2.0.7.11 (OptiGene) z normalizacijo med 0 in 600 sekundami in glajenjem 3 točk. Amplifikacijski krivulji negativnih kontrol sta prikazani s črtkanimi črtami.

3.3 Prenosljivost poenostavitev na druge teste LAMP

538

Z uporabo vnaprej pripravljenih reagentov in kontrolnih materialov smo uspešno poenostavili izvedbo testa LAMP za določanje bakterij kompleksa vrst *Ralstonia solanacearum* (Lenarčič *in sod.*, 2014). Učinkovito smo ločili dele procesa, za katere sta koristna nadzorovano okolje in specializirana oprema (za delo z majhnimi volumni), od dejanskega izvajanja testov na terenu. S tem lahko omogočimo izvedbo LAMP z manj specializirane opreme tudi manj izkušenim operaterjem, ki teste redkeje izvajajo. Stabilnost reagentov je pogosto prenosljiva med specifičnimi testi, zato pričakujemo, da so podobni reagenti drugih testov LAMP podobno stabilni in jih je zato mogoče pripravljati vnaprej ter tako olajšati izvajanje reakcij LAMP na terenu.

Dodajanje vzorca v praksi na terenu bi po pričakovanjih izvajali brez pipetiranja, saj natančnost ni zahtevana kadar analiziramo npr. gomolje krompirja z bolezenskimi znamenji rjave gnilobe, ki jo povzroča *R. solanacearum* ali določamo bakterije *Xylella fastidiosa* v žuželkah. Kot so poročali Lenarčič *in sod.* (2014), pogosto zadostuje dodajanje bakterijskega izcedka v samo reakcijo, ki jo lahko, če je potrebno, v predkoraku testa LAMP v instrumentu Genie II® dodatno segrejemo na višjo temperaturo. Ob tem se iz celic sprosti dovolj DNA, da jih lahko zaznamo. Podoben pristop je bil opisan za nekatere žuželke, ki jih je mogoče določati s tehnologijo LAMP iz česar sklepamo, da so opisane poenostavitve postopka perspektivne tudi za področje entomologije. Uporaba testa LAMP je na področju entomologije še v začetnih fazah, zato so poenostavitve še posebej dobrodošle.

4 SKLEPI

V študiji stabilnosti vnaprej pripravljenih reagentov za test LAMP za določanje bakterije *Ralstonia solanacearum* ter ustreznih kontrolnih materialov, smo potrdili, da so stabilni vsaj dve leti. S predhodno pripravo reagentov in kontrolnih materialov učinkovito poenostavimo izvedbo testa LAMP. S tem lahko omogočimo izvedbo testa z manj specializirane opreme tudi manj izkušenim operaterjem, ki teste redkeje izvajajo, ter s tem povečamo uporabnost diagnostike za terensko delo.

5 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 bolezni 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. Prispevek je bil na konferenci predstavljen v obliki postra, ki je dostopen na spletnem repozitoriju Zenodo.

6 LITERATURA

- Izvedbena uredba Komisije (EU) 2022/1193 z dne 11. julija 2022 o uvedbi ukrepov za izkoreninjenje in preprečevanje širjenja bakterije *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996 emend. Safni *et al.* 2014. UL L 185 12.7.2022, str. 27–46.
- Lenarčič, R., Morisset, D., Pirc, M., Llop, P., Ravnikar, M. in Dreo, T., 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. PLoS ONE 9, e96027 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096027>.
- Pirc, M., Alič, Š. in Dreo, T., 2021. Rapid loop-mediated isothermal amplification for detection of the *Ralstonia solanacearum* species complex bacteria in symptomatic potato tubers and plants, V: Dobnik, D., Gruden, K., Ramšak, Ž., Coll, A. (ur.), *Solanum Tuberosum*, Methods in Molecular Biology. Springer US, New York, NY, str. 401–413, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1609-3_20.
- PM 7/21 (3) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex), 2022. EPPO Bulletin 52, 225–261, <https://doi.org/10.1111/epp.12837>.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. Int J System Evolut Microbiol 64:3087–3103
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y., 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiology and Immunology 39, 897–904. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x>.
- Turnšek, N., Alič, Š., & Dreo, T. Dolgotrajna stabilnost predpripravljenih reagentov omogoča poenostavitev izvedbe izotermne reakcije LAMP za zaznavanje bolezni rastlin na terenu (Version 1). 16. Slovensko posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo v letu 2024 (SPVR), Bohinjska Bistrica. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10731940>.