

## IZOTERMICZNA TECHNIKA LAMP W DIAGNOSTYCE WIRUSÓW ZIEMNIAKA

*dr inż. Agnieszka Przewodowska*

*mgr inż. Bogumiła Zacharzewska, dr Krzysztof Treder*

*IHAR – PIB, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii w Boninie*

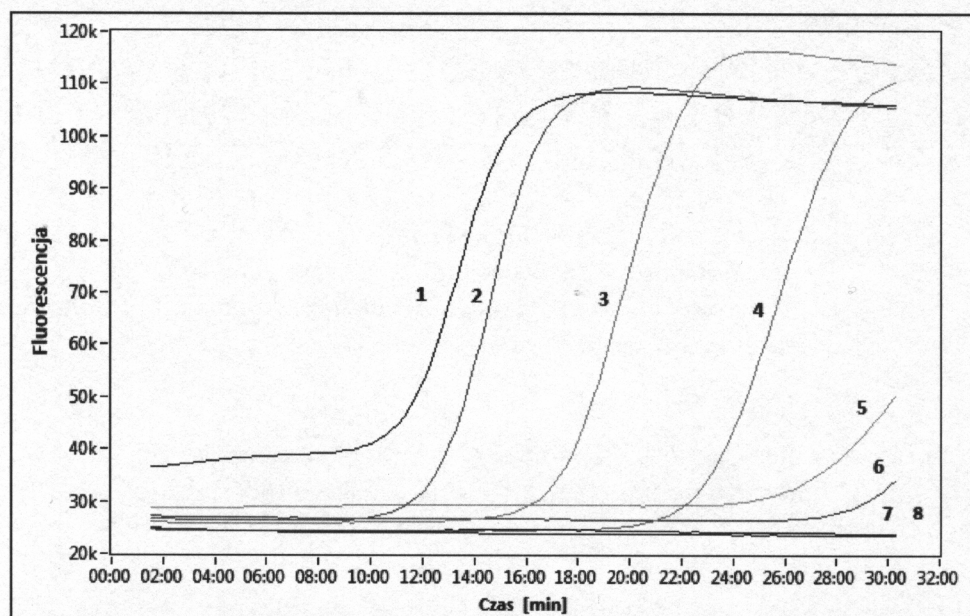
*e-mail: a.przewodowska@ihar.edu.pl*

**L**ańcuchowa reakcja polimerazy (ang. PCR – Polymerase Chain Reaction) opracowana na początku lat 80. XX w. zrewolucjonizowała nauki biologiczne i przemysł biotechnologiczny. Ogromny postęp odnotowano również w diagnostyce patogenów zwierząt i roślin. Metoda PCR pozwala na namnażanie śladowych ilości DNA, w sposób wysoce specyficzny, zależny od zastosowanych starterów. Wykonanie odwrotnej transkrypcji (czyli przepisania RNA na DNA), jako etapu poprzedzającego reakcję PCR, umożliwia wykrywanie tą metodą również wirusów, których genomy są zbudowane z RNA.

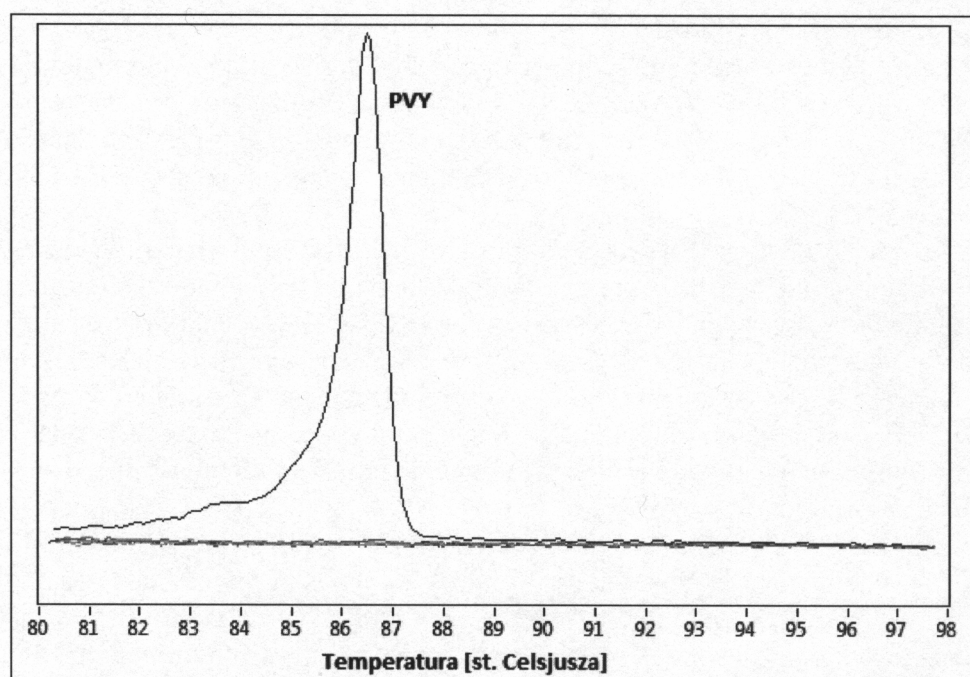
Mimo niewątpliwych zalet diagnostyka wirusów oparta na teście RT-PCR wiąże się z wysokimi kosztami aparatury umożliwiającej śledzenie reakcji w czasie rzeczywistym. Dlatego poszukuje się alternatywnych metod amplifikacji DNA, niewymagających cyklicznych zmian temperatury, a tym samym użycia kosztownych termocyklerów. Jedną z takich metod jest izotermiczna amplifikacja DNA za pośrednictwem tzw. pętli (ang. Loop-mediated isothermal amplification – LAMP).

LAMP jest metodą wysoce specyficzną, w której stosuje się 4-6 starterów rozpoznających regiony identyfikowanego DNA. Regiony komplementarne, do których przyłączają się startery, dobiera się w taki sposób, że w przypadku reakcji pozytywnej powstający pierwotny produkt reakcji tworzy pętle na obu swoich końcach. W drugim etapie kolejna para starterów przyłącza się do komplementarnych względem siebie miejsc i inicjuje wymianę jednej z nici DNA. Zastosowanie trzeciej pary starterów skutkuje zwiększeniem czułości i szybkości namnażania DNA. Cały proces amplifikacji zachodzi w stałej temperaturze ok. 60-65°C. W reakcji kluczowym elementem jest enzym polimeraza DNA mający zdolność do wymiany jednej z nici DNA (ang. strand displacement activity). Metoda LAMP pozwala na szybką i niezwykle wydajną amplifikację DNA, w optymalnych warunkach reakcja zachodzi w ciągu 15-30 minut. Obserwacja wyników badania może być prowadzona w czasie rzeczywistym przy użyciu aparatów Real Time PCR oraz gołym okiem w przypadku użycia odpowiednich odczynników chemicznych. Dzięki temu LAMP nadaje się do opracowania szybkich testów polowych, w których patogeny można wykrywać bezpośrednio w terenie.

W Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii ZNiOZ w Boninie zaprojektowano startery i opracowano warunki reakcji LAMP do wykrywania wirusa Y ziemniaka (PVY). Zoptymalizowana metoda umożliwia wykrycie infekcji wirusowej nawet przy 1 pg RNA z porażonych roślin w reakcji (rys. 1). Jednocześnie nie zaobserwowano reakcji niespecyficznych względem innych wirusów ziemniaka (rys. 2). Analiza krzywych topnienia produktów amplifikacji wykazała obecność tylko jednego piku, dla próby PVY. Próby zawierające RNA pochodzące z PVM, PLRV, PVS i PVX nie uległy amplifikacji.



Rys. 1. Profil amplifikacji prób z różną ilością RNA izolowanego z roślin porażonych PVY  
 1 – 100 ng/reakcję, 2 – 10 ng/reakcję, 3 – 1 ng/reakcję, 4 – 0,1 ng/reakcję,  
 5 – 0,01 ng/reakcję, 6 – 0,001 ng/reakcję, 7 – RNA z rośliny zdrowej, 8 – woda



Rys. 2. Krzywa topnienia produktu amplifikacji RNA w próbce z roślin porażonych PVY