

## Opracowanie izotermicznego testu RT - LAMP do wykrywania wirusów ziemniaka

*Bogumiła Zacharzewska, Joanna Chołuj, Krzysztof Treder*

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Nasien-  
nictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie. zacharzewska@ihar.edu.pl

Obecnie najczęściej stosowanymi metodami wykrywania infekcji wirusowych w ziemniakach są – DAS-ELISA, RT-PCR i RT-PCR w czasie rzeczywistym. Za pomocą DAS-ELISA można testować wiele prób jednocześnie, dzięki czemu metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w rutynowej ocenie porażenia ziemniaków wirusami. Metody molekularne umożliwiają wykrywanie wirusów z czułością o kilka rzędów wielkości wyższą niż DAS-ELISA, są jednak stosunkowo kosztowne a ich wykonanie jest czasochłonne, przez co nie są wykorzystywane w rutynowej diagnostyce wirusów ziemniaka. Dobrą alternatywę dla obu grup metod może stanowić izotermiczna amplifikacja kwasów nukleinowych oparta o tworzenie zapętlonych fragmentów DNA i ich amplifikację za pomocą 4 lub 6 starterów (Loop-mediated AMplification – LAMP). Reakcję LAMP wykonuje się w temperaturze 60-65°C. W tych warunkach niektóre regiony DNA oscylują pomiędzy stanem jedno- i dwuniciowym. Umożliwia to przyłączenie starterów, zaprojektowanych dla tych regionów i ich wydłużanie przez polimerazę posiadającą aktywność wymiany nici. Dzięki tym cechom w LAMP nie trzeba denaturować termicznie namnażanego fragmentu DNA. W połączeniu z reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-LAMP) metoda umożliwia wykrywanie patogenów, których genom zbudowany jest z kwasu rybonukleinowego (Notomi, 2000), np. wirusów ziemniaka. RT-LAMP pozwala na wykrywanie wirusów z co najmniej taką samą czułością jak RT-PCR w znacznie krótszym czasie a amplifikację można monitorować w czasie rzeczywistym, dzięki czemu możliwa jest analiza wielu prób jak w DAS-ELISA.

Dlatego w niniejszej pracy podjęto próbę opracowania testu RT-LAMP stosując jako model wirus *Y ziemniaka* (PVY), stanowiący obecnie największe zagrożenie dla upraw ziemniaków (Wróbel i Wąsik 2013). W tym celu zaprojektowano zestaw starterów Y5 w oparciu o konserwatywny region sekwencji kodującej białko płaszczka PVY. Reakcję RT-LAMP wykonano w 65°C. Mieszanina reakcyjna (25 µl) zawierała 3 pary starterów Y5 (wewnętrzne FIP i BIP, zapętlające LF i LB, zewnętrzne F3 i B3), 15 µl Isothermal Ma-

stermix Fluorescent Dye (IS0-001, Novazym), 10 U odwrotnej transkryptazy (Roche) oraz 1 µl RNA wyizolowanego z badanych prób. Czułość RT-LAMP porównano do testów paskowych (LFA), testu DAS-ELISA oraz RT-PCR. Porównanie czułości metod wykrywania, przeprowadzono stosując sok uzyskany z liści ziemniaka zakażonego PVY. Przygotowano rozcieńczenia soku buforem do prób DAS-ELISA (1xPBS; 2% PVP; 0,05% Tween 20) i wykonano serię rozcieńczeń od dziesięciu do miliona razy. Test paskowy LFA (PVY AgriStrip, Bioreba, nr kat.: 112981) i DAS-ELISA (Bioreba PVY przeciwciała poliklonalne, nr kat.: 110580) przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producentów, wykorzystując przygotowaną serię rozcieńczeń. W celu określenia czułości metod molekularnych z każdego przygotowanego rozcieńczenia izolowano całkowite RNA. Tak przygotowane próby analizowano za pomocą RT-LAMP oraz testem RT-PCR wykonanym wg Zacharzewska i inni (2014). Każde doświadczenie powtarzano co najmniej trzy razy.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że metoda RT-LAMP posiada czułość około 10-razy wyższą od RT-PCR oraz około 1000-razy wyższą od DAS-ELISA i testów paskowych (LFA). Z uwagi na wysoką czułość i dużą łatwość wykonania, opracowana metoda RT-LAMP ma duży potencjał aplikacyjny do rutynowej diagnostyki PVY.

#### LITERATURA:

- Notomi T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28: 63e–63.
- Wróbel S., Wąsik A. 2013. Seed potato production in Poland. *American Journal of Potato Research* 3: 260-268.
- Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014. The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of *Potato virus Y*. *American Journal of Potato Research* 91: 525-531.