

Zastosowanie izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych w diagnostyce wirusa Y ziemniaka

Krzysztof Treder, Bogumiła Zacharzewska, Joanna Chołuj

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy; Zakład Nasiennictwa
i Ochrony Ziemniaka w Boninie; k.treder@ihar.edu.pl

Opracowana na początku lat osiemdziesiątych XX wieku metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (ang.: PCR – Polymerase Chain Reaction) zrewolucjonizowała nauki biologiczne i przemysł biotechnologiczny włącznie z diagnostyką patogenów zwierząt i roślin. Można za jej pomocą namnażać specyficzne fragmenty kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). W połączeniu z reakcją odwrotnej transkrypcji kwasu rybonukleinowego (RNA) do DNA (ang.: RT – reverse transcription) jako test RT-PCR pozwala na czułą i specyficzną detekcję wirusów, których genomy zbudowane są z RNA. Czułość RT-PCR znacznie przewyższa czułość metod immunologicznych, nawet o kilka rzędów wielkości. Jednak pomimo niewątpliwych zalet, jego wadą jest wysoki koszt aparatury, szczególnie dla wariantów umożliwiających śledzenie reakcji w czasie rzeczywistym (real time RT-PCR). Sam RT-PCR jest również droższy od testu PCR, z uwagi na koszt izolacji RNA oraz odwrotnej transkryptazy – enzymu „przepisującego” RNA na jednoniciowe cDNA. Również opracowanie, standaryzacja i wdrożenie testu wiąże się z ponoszeniem wysokich kosztów.

Dlatego w ciągu ostatniej dekady uczeni rozwijający diagnostykę molekularną poszukiwali alternatywnych metod amplifikacji DNA, niewymagających cyklicznych zmian temperatury, a co za tym idzie – kosztownych termocyklerów. Poszukiwania te skutkowały opracowaniem szeregu metod amplifikacji DNA i RNA zachodzących w jednej temperaturze, czyli w warunkach izotermicznych. Metody izotermiczne nie wymagają stosowania drogiej aparatury do przeprowadzenia reakcji. Ponadto często charakteryzują się dużo większą szybkością i wydajnością amplifikacji niż PCR. Pozwala to na wykonanie testu w ciągu 15-30 minut przy zachowaniu lub nawet przekroczeniu czułości testu PCR. Pośród wielu obecnie istniejących metod najbardziej obiecująca wydaje się izotermiczna amplifikacja DNA za pośrednictwem pętli (ang.: Loop-mediated isothermal amplification – LAMP). W metodzie sto-

suje się od 4 lub 6 starterów rozpoznających specyficznie 6-8 regionów DNA. Dzięki temu LAMP jest metodą wysoce specyficzną. Startery można podzielić na wewnętrzne, zewnętrzne i zapętlające. Do wewnętrznych zaliczamy FIP (Forward Inner Primer) oraz BIP (Backward Inner Primer). Ich sekwencje są komplementarne do dwóch różnych miejsc w nici sensownej i antysensownej. Dzięki temu powstający pierwotny produkt reakcji tworzy jednoniciowe pętle na obu końcach. Startery zewnętrzne F3 (Forward) i B3 (Backward) są komplementarne do regionów okalających fragment amplifikowany przez startery wewnętrzne. Startery te są krótsze, a ich stężenie w reakcji jest niższe po to by wolniej od FIP i BIP hybrydowały do matrycy. Ich rola polega na inicjowaniu zastępowania nici w dupleksie DNA przez nowo powstającą nić potomną. W celu zwiększenia szybkości i czułości reakcji można dodatkowo stosować komplementarne dla regionów pętli startery zapętlające LoopF i LoopR. LAMP wykonywany jest w 60-65°C, a startery projektowane są dla regionów, które w tej temperaturze oscylują pomiędzy stanem dwuniciowym i jednoniciowym. Umożliwia to przyłączenie starterów do nici docelowych bez etapu denaturacji termicznej dwuniciowego DNA. Polimeryzację nici potomnych katalizuje DNA zależna DNA polimeraza posiadająca zdolność do wymiany w dupleksie DNA nici komplementarnej na nowo syntetyzowaną nić (ang.: strand displacement activity). Metoda LAMP pozwala na szybką i niezwykle wydajną amplifikację DNA. Reakcja w optymalnych warunkach zachodzi w ciągu 5-30 minut. Ilość produkowanego DNA jest tak duża, że pochodzący ze wbudowywanych do potomnej nici nukleotydów pirofosforan wraz z magnezem tworzy nierozpuszczalną sól. Jest ona widoczna gołym okiem, jako zmętnienie w próbach pozytywnych. Dzięki temu LAMP nadaje się do opracowania szybkich testów polowych, w których patogeny można wykrywać bezpośrednio w terenie. Dla dodatkowego zwiększenia czułości opracowano wiele wariantów LAMP, wykorzystujących urządzenia pozwalające na pomiar zmętnienia, zmiany koloru lub fluorescencji zarówno po zakończeniu reakcji, jak i w czasie rzeczywistym. W większości tych testów pozytywny wynik reakcji widać gołym okiem, aparatura jedynie ułatwia ilościową analizę wyników. LAMP wydaje się idealnym następcą PCR. W ciągu ostatnich pięciu lat powstało ponad 5000 publikacji opisujących procedury LAMP i RT-LAMP do wykrywania bakteryjnych, grzybowych i wirusowych patogenów zwierząt i roślin (wg Google Scholar). Metoda ma jednak mniejszy potencjał w zakresie różnicowania genetycznego. Czułość i specyficzność LAMP pozwala na wykrywanie nawet jedno-nukleotydowych różnic (SNP), a zastosowanie specjalnych sond fluorescencyjnych umożliwia jednoczesną detekcję kilku patogenów lub szczepów danego patogenu. Jednak duża liczba starterów i wysoka wydajność syntezy DNA produktu mogą stanowić dużą przeszkodę w opracowaniu multipleksowych wariantów LAMP do wykrywania czy różnicowania szczepów patogenów lub wariantów genu.

Dużą zaletą omówionej metody jest to, że jest ona całkowicie skomercja-

lizowana i dostępne są zestawy dostosowanych do różnych sposobów wykrywania produktu. W praktyce eliminuje to konieczność optymalizacji warunków reakcji i skraca czas oraz nakład pracy potrzebny do opracowania testu diagnostycznego. Dostępność darmowych i komercyjnych programów do projektowania starterów do LAMP, również ułatwia opracowanie specyficznej dla docelowego patogenu procedury. Dlatego w ciągu ostatniej dekadety prowadzono intensywne prace nad aplikacją RT-LAMP w diagnostyce. Szczególnym wyzwaniem są wirusy, których genom zbudowany jest z RNA. Kwas rybonukleinowy jest znacznie mniej stabilny od DNA, łatwo ulega samoczynnej degradacji. Ponadto z uwagi na powszechną obecność rybonukleaz w próbach biologicznych jest dodatkowo narażony na szybkie trawienie przez te enzymy. Trudnym materiałem do wykrywania RNA wirusów są tkanki i organy ziemiaka, rośliny bogatej nie tylko w rybonukleazy, ale również w polifenole, skrobię i enzymy katalizujące szereg reakcji redox. Metody skutecznego wykrywania RNA wirusów w takim materiale mają duży potencjał aplikacyjny do wykrywania wirusów w innych materiałach biologicznych. Dlatego w pracach prowadzonych w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii (IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie) jako model do badań nad opracowaniem szybkiej i skutecznej metody wykrywania wirusów za pomocą RT-LAMP wybrano wirus *Y ziemiaka* (PVY), który poza omówionymi wyżej przyczynami spełnia dodatkowo tę, że jest bardzo podobny do ważnej grupy wirusów zwierzęcych – rodziny *Picornaviridae*, grupującej wirusy wywołujące groźne choroby ludzi i zwierząt.

W trakcie prac prowadzonych w Pracowni, zauważono, że test wykorzystujący zaprojektowane przez zespół Pracowni startery pozwala na szybkie wykrycie obecności cząstek wirusowych, nawet w czasie 8-15 minut. Test można wykonywać w łaźni wodnej lub w jakimkolwiek inkubatorze zapewniającym uzyskanie 60-65°C. Jednak bardziej jednolite warunki temperaturowe oraz możliwość monitorowania postępu reakcji w czasie rzeczywistym umożliwia urządzenie do amplifikacji izotermicznej firmy OptiGen – Genie II. Urządzenie jest niewielkie, można je zasilać baterią, dlatego nadaje się do wykonywania testów polowych. Ponadto pozwala na pomiar fluorescencji, dzięki czemu czułość wykrywania wirusów znacznie wzrasta. Aby test można było wykonać w warunkach polowych, zespół Pracowni opracował szybką metodę izolacji RNA bez konieczności stosowania wirówek, czy innych urządzeń laboratoryjnych. Do prac stosowano komercyjny zestaw do fluorescencyjnego wariantu testu RT-LAMP firmy Novazym-Polska. Zestaw zawiera wszystkie odczynniki do wykonania reakcji łącznie z polimerazą posiadającą aktywność wymiany nici, potrzebną do „rozplatania” podwójnej nici DNA w warunkach izotermicznych. Do mieszaniny reakcyjnej wystarczy dodać odwrotną transkryptazę, startery oraz RNA wyizolowane z badanej próby i wstawić próbę do bloku urządzenia Genie II. Po ok 12-15 min na monitorze urządzenia widać krzywą obrazującą amplifikację fragmentu genomu wirusa, jeżeli był on obecny w badanej próbce. Opracowany test RT-LAMP pozwala

na specyficzne wykrycie PVY w ciągu 30-40 minut (od pobrania próby do uzyskania wyniku) i jest 10-krotnie bardziej czuły niż RT-PCR. Opracowany test można wykonać zarówno w laboratorium, jak i w warunkach polowych. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że aplikacja innych metod izotermicznych do wykrywania PVY ma duże szanse powodzenia.