

WYKRYWANIE WIRUSA Y ZIEMNIKA ZA POMOCĄ IZOTERMICZNEJ AMPLIFIKACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH

dr Krzysztof Treder, mgr inż. Bogumiła Zacharzewska, mgr inż. Joanna Chołuj

IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemi w Boninie

e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Opracowana na początku lat 80. 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 są zbudowane 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.

W ciągu ostatniej dekady uczeni rozwijający diagnostykę molekularną poszukiwali alternatywnych metod amplifikacji DNA, niewymagających cyklicznych zmian temperatury. 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 dużą 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 stosuje się od 4 lub 6 starterów rozpoznających specyficznym 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 są projektowane 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. Ilość produkowanego DNA jest tak duża, że pochodzący z wbudowywanych do potomnej nici nukleotydów pirofosforan wraz z magnezem tworzy nierozpuszczalną sól. Jest ona widoczna gołym okiem jako zmętnienie w próbach pozytywnych. Dla dodatkowego zwiększenia czułości opracowano wiele wariantów LAMP z wykorzystaniem urządzeń pozwalających na pomiar zmętnienia, zmiany koloru lub fluorescencji zarówno po zakończeniu reakcji, jak i w czasie rzeczywistym.

Z uwagi na zalety tej metody w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii (IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie) podjęto badania nad opracowaniem szybkiej i skutecznej procedury wykrywania wirusów za pomocą RT-LAMP, stosując jako model wirus Y ziemniaka (PVY). W trakcie prac 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 min (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 metod izotermicznych do wykrywania PVY ma duże szanse powodzenia.