

# OPRACOWANIE IZOTERMICZNEGO TESTU RT - LAMP DO WYKRYWANIA WIRUSÓW ZIEMNIAKA



Bogumiła Zacharzewska, Joanna Chołuj, Krzysztof Treder  
IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie

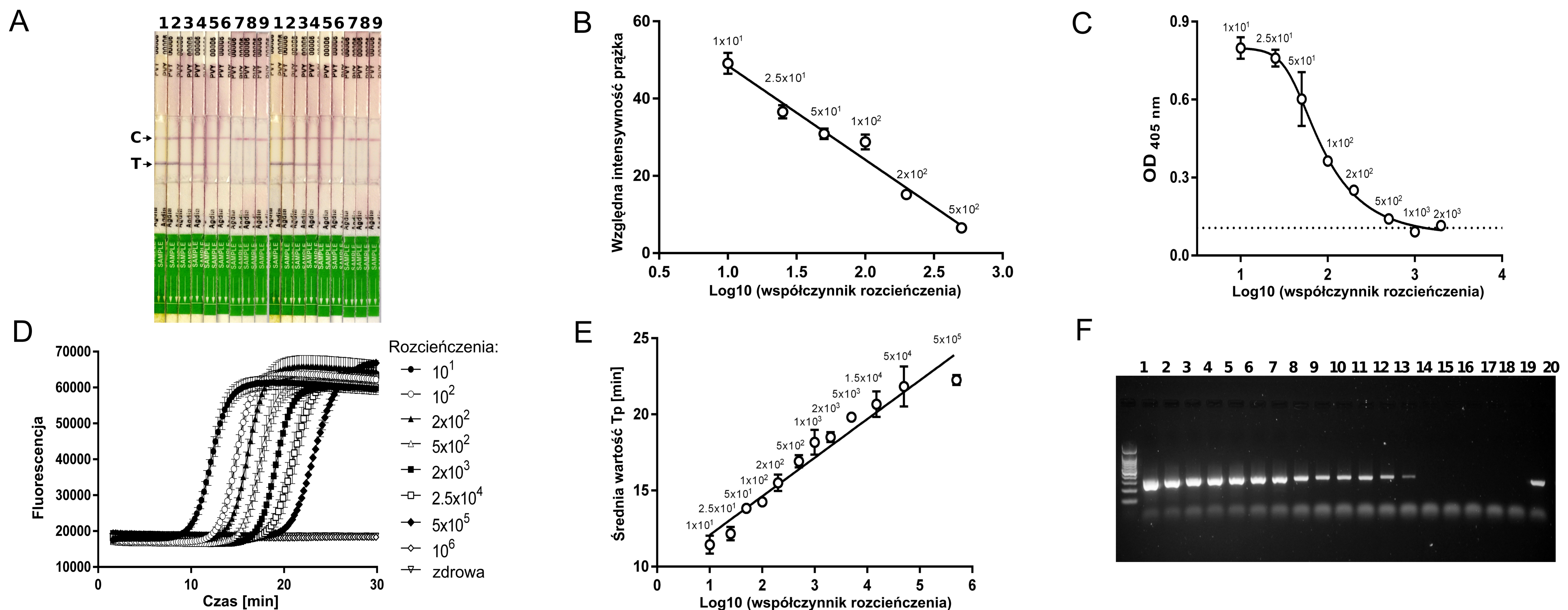
## WSTĘP

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 zapętlnionych 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.

## MATERIAŁY I METODY

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 Mastermix Fluorescent Dye (ISO-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.

## WYNIKI



**Rys. 1 Porównanie czułości LFA, DAS-ELISA, RT-LAMP i RT-PCR.**

**A** Określenie czułości wykrywania PVY za pomocą testów paskowych LFA (PVY AgriStrip, Bioreba, nr kat.: 112981). Paski umieszczano w probówkach wypełnionych 0,2 ml soku pochodzącego z rośliny zakażonej PVY i rozcieńczono 1x10<sup>1</sup> – 1; 2,5x10<sup>1</sup> – 2; 5x10<sup>1</sup> – 3; 1x10<sup>2</sup> – 4; 2x10<sup>2</sup> – 5; 5x10<sup>2</sup> – 6; 1x10<sup>3</sup> – 7; 2x10<sup>3</sup> – 8. Sok zdrowej rośliny, rozcieńczono 10-krotnie, użyto jako kontrola negatywna - 9. Wirus strefa pozytywne - T, strefa kontroli testu - C. Na zdjęciu widoczne są trzy powtórzenia.

**B** Ilościowa analiza wyników uzyskanych w panelu A. Testy paskowe zostały sfotografowane po zakończeniu testu a intensywność prążków C i T, została przedstawiona ilościowo dzięki oprogramowaniu do analizy żeli 1D Phoretix.

**C** Określenie czułości wykrywania PVY za pomocą DAS-ELISA.

**D** Określenie czułości testu RT-LAMP. Kontrola negatywna zawierała RNA ze zdrowej rośliny.

**E** Średni czas do uzyskania wartości dodatnich (Tp), wykreślony w funkcji logarytmu współczynnika rozcieńczenia.

**F** Wyznaczenie czułości wykrywania PVY przez RT-PCR w soku z rośliny zakażonej PVY za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. Marker 100-1000 bp (Novazym) – 1. Rozcieńczenia soku 1x10<sup>1</sup> – 2; 2,5x10<sup>1</sup> – 3; 5x10<sup>1</sup> – 4; 1x10<sup>2</sup> – 5; 2x10<sup>2</sup> – 6; 5x10<sup>2</sup> – 7; 1x10<sup>3</sup> – 8; 2x10<sup>3</sup> – 9; 5x10<sup>3</sup> – 10; 1x10<sup>4</sup> – 11; 1,5x10<sup>4</sup> – 12; 2,5x10<sup>4</sup> – 13; 5x10<sup>4</sup> – 14; 5x10<sup>5</sup> – 15; 1x10<sup>6</sup> – 16. Kontrole negatywne: reakcja odwrotnej transkrypcji z dodatkiem wody, a nie RNA – 17; reakcja PCR z dodatkiem wody zamiast cDNA – 18; reakcja RT-PCR z dodatkiem RNA ze zdrowej rośliny – 19. Kontrola pozytywna: reakcja RT-PCR zawierająca RNA z rośliny porażonej PVY – 20.

## WNIOSKI

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