

Российская академия сельскохозяйственных наук
Государственное научное учреждение
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ КАРТОФЕЛЬНОГО ХОЗЯЙСТВА им. А.Г. ЛОРХА

НОВЫЙ МЕТОД ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ
ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ
НА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-ПОЛОСКАХ
(РЕКОМЕНДАЦИИ)

Москва - 2010

УДК: 635.21: 631.532.2.026

В подготовке нового метода экспресс-диагностики вирусов картофеля на иммунохроматографических тест-полосках принимали участие сотрудники: ГНУ ВНИИКХ Россельхозакадемии – к.б.н. А.И.Усков, к.б.н. Б.В.Анисимов, Ю.А.Варицев, Д.В.Кравченко, к.с.-х.н. Е.В.Овэс; МГУ им. М.В.Ломоносова – д.б.н., академик РАН И.Г.Атабеков, к.х.н. А.Н.Блинцов, к.х.н. А.П.Осипов, к.х.н. В.Г.Григоренко, к.х.н. И.П.Андреева, Ю.Ф.Дрыгин.

Рецензент – к.с.-х.н. С.М.Юрлова.

Ответственный за выпуск – к.б.н. А.И.Усков.

Новый метод экспресс-диагностики вирусов картофеля на иммунохроматографических тест-полосках: (Рекомендации) / Россельхозакадемия, ВНИИКХ; А.И.Усков, Б.В.Анисимов, Ю.А.Варицев, Д.В.Кравченко, Е.В.Овэс (ГНУ ВНИИКХ Россельхозакадемии), Ю.Ф.Дрыгин, А.Н.Блинцов, А.П.Осипов, В.Г.Григоренко, И.П.Андреева, И.Г.Атабеков (МГУ им. М.В.Ломоносова). – М., 2010.- 13 с.

Разработанные отечественные иммунохроматографические тест-системы предназначены для определения X-, M- и Y-вирусов картофеля, могут успешно применяться при клоновом отборе в семеноводстве картофеля позволяя селекционерам самостоятельно оценить свой материал на устойчивость к вирусам.

Анализ основан на использовании высокоаффинных поликлональных антител, очищенных методом ступенчатой ионообменной хроматографии и способных эффективно взаимодействовать с множеством белковых антигенных детерминант вирусной частицы.

Рекомендации предназначены для специалистов Россельхозцентров и испытательных лабораторий, аккредитованных для контроля качества и сертификации семенного картофеля, а также для сотрудников и специалистов научно-исследовательских и учебных учреждений, элитно-семеноводческих хозяйств, сельскохозяйственных организаций и агропредприятий, занимающихся производством оригинального, элитного и репродукционного семенного картофеля.

Рассмотрено и одобрено на заседании Ученого совета ВНИИКХ 12 ноября 2010 г. протокол №10.

© Россельхозакадемия, ВНИИКХ, 2010

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	4
Принцип метода	5
Состав диагностического набора.....	7
Приготовление образцов	7
Проведение анализа и оценка результатов	8
Области применения метода	9
Литература	13

Введение

Высокая вредоносность вирусов, поражающих картофель, обусловлена тем, что под воздействием вирусной инфекции ухудшается рост и развитие растений, значительно снижается урожай, качество и товарность клубней. В настоящее время известно около 50 вирусов, идентифицированных на картофеле в различных странах и регионах с разнообразными природно-климатическими условиями. Основные мероприятия по борьбе с вирусными болезнями в системе производства оздоровленного семенного материала картофеля – изоляция семеноводческих посадок, прочистка визуально больных растений, удаление ботвы и ранняя уборка, диагностика вирусной инфекции.

В настоящее время лабораторная диагностика вирусных инфекций картофеля в основном осуществляется с помощью «сэндвич»-метода твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА), позволяющего количественно определять вирусы картофеля в экстрактах листового материала с пределом детекции, достигающим 1 нг вируса на 1 мл сока. При всех своих несомненных достоинствах метод занимает много времени, для использования требуется дорогостоящее оборудование и необходим квалифицированный персонал, что ограничивает область его применения специализированными лабораториями.

Для повсеместного массового мониторинга зараженности картофеля вирусами необходимы простые, надежные, высокоспецифичные и высокочувствительные экспресс-методы, применимые для широкого круга вирусов (значительно различающихся по морфологии, структуре и физико-химическим свойствам), позволяющие проводить экспресс-диагностику в полевых условиях рядовому пользователю без специальных навыков и оборудования. Поэтому одним из основных коммерческих требований, предъявляемых ко всем современным методам внелабораторной молекулярной диагностики (используемых в медицине, ветеринарии и

сельском хозяйстве), является полная готовность набора к проведению тестирования. Для проведения анализа достаточно лишь добавить анализируемый растительный экстракт, что инициирует, с одной стороны, специфические взаимодействия патогена с аналитом, а с другой - и формирование регистрируемого сигнала в аналитической и контрольной областях. Этим требованиям отвечает быстро развивающаяся современная аналитическая технология иммунохроматографического анализа (ИХА) широкого спектра биологически активных соединений различной природы, вытесняющая в силу своей простоты и скорости анализа традиционные твердофазные методы ИФА.

Являясь простым и эффективным диагностическим средством, иммунохроматографические экспресс-тесты позволяют в течение нескольких минут определить и оценить содержание различных биологически активных веществ в анализируемом образце без специальных навыков и оборудования даже в полевых условиях.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ основан на использовании высокоаффинных поликлональных антител, очищенных методом ступенчатой ионообменной хроматографии и способных эффективно взаимодействовать с множеством белковых антигенных детерминант вирусной частицы.

При погружении полоски в исследуемый растительный экстракт, содержащий определяемый вирус, вирусные частицы начинают мигрировать с фронтом жидкости вдоль поверхности мембраны под действием капиллярных сил. Перемещаясь по мембране, вирус образует иммунохимические комплексы с мечеными коллоидным золотом антителами, которые продолжают мигрировать дальше вместе с фронтом растворителя. Достигнув зоны иммобилизованных на мембране антител, вирус и комплекс вируса с антителами, мечеными коллоидным золотом, взаимодействуют с ними, образуя как тройной иммунокомплекс:

иммобилизованные антитела – вирус – антитела, меченые коллоидным золотом, так и комплекс определяемого вируса с иммобилизованными на мембране антителами. В результате формируется окрашенный тройной комплекс в виде узкой полосы, который хорошо различим визуально. Интенсивность окраски в аналитической зоне пропорциональна количеству вируса в анализируемой пробе.



На одно измерение, как и в твердофазных методах ИФА, требуется от 0,1 до 0,2 мл тестируемого раствора (10-20 мг листового материала), что делает данный метод особенно эффективным инструментом при диагностике малых количеств тестируемого растительного материала. Окрашенные пигменты сока листьев картофеля практически не мешают проведению инструментальной и визуальной оценки результатов анализа. Мембраны после проведения анализа сохраняют первоначальную окраску в аналитической и контрольной зонах длительное время и могут быть сканированы для количественной оценки результатов полевого тестирования с помощью отражательного фотометра. Повторное измерение интенсивности окраски полосок через 2 нед показало незначительное снижение интенсивности регистрируемого сигнала (не более 15%) по сравнению с данными, сканированными в день проведения анализа.

СОСТАВ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА

Диагностический набор для экспресс - определения вирусов картофеля на основе иммунохроматографии, на тест-полосках является совместной разработкой Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, ЗАО НВО «Иммунотех» и ГНУ ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г.Лорха Россельхозакадемии. Набор рассчитан на 50 анализов. В состав набора входят:

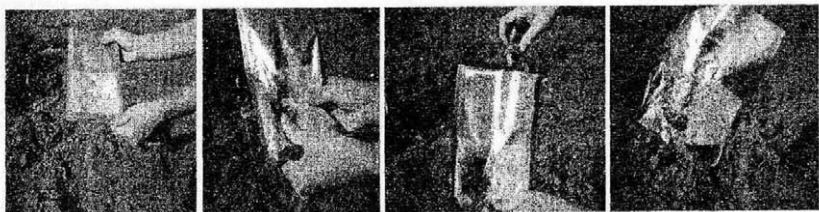
1. Диагностические тест-полоски в пластиковом планшете (иммуно-стрипы) – 50 шт.
2. Экстрагирующий буфер (0,01 М калий-фосфатный буфер, pH 7,2—7,5, содержащий 0,1 М NaCl, 0,1% Тритон.Х-100) - 1 пластиковый флакон, 250 мл.
3. Отрицательный контроль (сок листьев здорового картофеля в 50 % глицерине с 0,01 % мертиолятом натрия) – 1 флакон, 0,35 мл.
4. Пластиковые пакеты 12x14 см с мерной линией – 50 шт.
5. Сетки для растирания биопробы 10x10 см – 50 шт.
6. Пластиковые трубки 0,5x14 – 50 шт.
7. Инструкция по применению – 1 шт.

Тест-набор не содержит токсичных и опасных компонентов. Срок годности набора – 12 месяцев при 4°C в исходной упаковке

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Можно анализировать листовой материал картофеля или ростки клубней (1 – 2 см). Измельченную ткань или выжатый сок разбавить экстрагирующим буфером для проб в соотношении 1: 5 – 1: 10. Пример: на 0,1 г растительной ткани или 0,1 мл сока надо взять 0,5 – 1,0 мл буфера. Процедура разбавления сока выполняется непосредственно в пластиковом пакете при растирании образца в течение 1,5-2,0 мин с помощью сеточки. Пример: в пакет поместить биоматериал (лист картофеля) и механически растереть с использованием сеточки, затем налить с помощью

автоматической микропипетки 0,5-1,0 мл буфера для проб. Выделяющийся при разрушении тканей сок перемешивается с экстрагирующим буфером. В лабораторных условиях можно растереть образцы в фарфоровых ступках, тщательно промывая их после каждого анализа. Также для получения сока можно использовать вальцовый пресс. В полевых условиях при отсутствии пипеток либо другой мерной посуды буфер можно наливать до метки на пакете – примерно 5 мл, вес биоматериала определяется приблизительно (0,5-1 г.)



ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Поместить конец диагностической тест-полоски со стороны фильтрующей мембраны в разбавленный экстрагирующим раствором сок анализируемого образца непосредственно в пластиковом пакете. Через 3-5 минут при достижении капиллярным фронтом зоны адсорбирующей мембраны вынуть диагностическую полоску и поместить на ровную поверхность.

Проведение экспресс-анализа с использованием диагностического набора возможно в полевых условиях без специального оборудования и приспособлений.

Оценку результатов иммунохроматографического экспресс-анализа проводят – визуально.

При визуальной оценке результатов анализа, дающей информацию “да” или “нет”, можно применить следующую шкалу:

растение здорово – одна окрашенная контрольная полоса, как в отрицательном контроле;

растение заражено – две окрашенных полосы: в контрольной и аналитической зонах.



ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

Диагностика меристемных растений *in vitro*.

При оздоровлении сортов картофеля методом апикальной меристемы процент выхода растений регенерантов как правило невелик. Поэтому единичные экземпляры меристемных растений *in vitro* можно быстро проверить на наличие или отсутствие вирусов и сразу же расчеренковать здоровые регенеранты.

Диагностика родительских форм и гибридов в селекционном процессе.

Селекционер может самостоятельно оценить свой материал на устойчивость к вирусам.

Полевая диагностика клонов БЗСК

Высокую эффективность данный метод показал при отборе базовых клонов в банке здоровых сортов картофеля (БЗСК), расположенном в Архангельской области. Данные представлены в таблице 1.

Всего было продиагностировано 28 сортов картофеля. По каждому сорту оценено по 10 клонов, по сорту Жуковский ранний – 60 клонов, по

сорту Удача – 70 клонов. Полностью здоровыми по данным иммунохроматографии оказались клоны сортов Каратоп, Наяда, Малиновка, Ред Скарлет, Любава, Кураж, Чародей, Ильинский, Беллароза, Солист.

Таблица 1. - Отбор базовых клонов по результатам иммунохроматографического анализа.

Сорт	Проанализировано клонов, шт.	Отобрано здоровых клонов, шт.	Выбраковано зараженных вирусами, шт.
Брянский надежный	10	7	3
Каратоп	10	10	0
Ред Скарлет	10	10	0
Наяда	10	10	0
Малиновка	10	10	0
Лорх	10	7	3
Ладожский	10	7	3
Никулинский	10	9	1
Холмогорский	10	6	4
Любава	10	10	0
Роко	10	8	2
Голубизна	10	7	3
Жуковский ранний	60	57	3
Кураж	10	10	0
Удача	70	68	2
Ресурс	10	8	2
Крепыш	10	9	1
Чародей	10	10	0
Ильинский	10	10	0
Розара	10	9	1
Невский	10	5	5
Раменский	10	2	8
Беллароза	10	10	0
Солист	10	10	0
Импала	10	9	1
Латона	10	8	2
Рябинушка	10	7	3
Накра	10	8	2

Высокий выход здоровых клонов (70-90%) наблюдался у сортов Брянский надежный, Лорх, Ладожский, Никулинский, Роко, Голубизна, Жуковский ранний, Удача, Ресурс, Крепыш, Розара, Импала, Латона, Рябинушка, Накра. Наибольшим процентом выбраковки больных клонов характеризовались сорта Раменский, Невский, Холмогорский.

При помощи иммунохроматографических тест-полосок среди всех сортов были выявлены: ХВК – в 23 клонах, УВК – в 15 клонах, МВК – в 21 клоне. Клоны 17-ти сортов, здоровые по данным иммунохроматографии были дополнительно проанализированы в зимний период 2008-2009 гг. методом ИФА глазковым тестом. (таблица 2)

Таблица 2. – Сравнительные результаты иммунохроматографического и иммуноферментного анализов

Сорт	Кол-во клонов шт.	Обнаружено вирусов методом ИХА, шт			Число здоровых клонов отобранных для глазкового теста, шт	Обнаружено вирусов методом ИФА, шт			Число клонов здоровых по ИФА, шт
		Х	М	У		Х	М	У	
Розара	10	0	0	1	7	0	0	1	6
Невский	10	0	2	3	5	0	0	0	5
Удача	10	1	1	0	3	0	0	0	3
Никулинский	10	0	1	0	5	0	1	0	4
Холмогорский	10	0	0	4	4	0	0	1	3
Ладожский	10	3	2	1	3	0	0	1	2
Накра	10	1	1	0	5	0	0	0	5
Раменский	10	8	0	0	2	2	1	0	0
Ред Скарлет	10	0	0	0	7	0	0	0	7
Ильинский	10	0	0	0	5	0	0	0	5
Роко	10	2	0	0	3	0	0	0	3
Чародей	10	0	0	0	8	0	0	0	8
Наяда	10	0	0	0	5	0	0	0	5
Любава	10	0	0	0	7	0	0	0	7
Лорх	10	1	1	2	5	0	0	0	5
Голубизна	10	1	2	0	4	0	1	0	3
Каратоп	10	0	0	0	8	0	0	0	8
ИТОГО	170	17	10	11	86	2	3	3	79

Как видно из таблицы, из 86 клонов всех сортов свободных от вирусов по результатам полевого иммунохроматографического анализа 79 оказались свободными от вирусов по результатам послеуборочного ИФА. Соответствие результатов составило 92%, что незначительно отличалось от совпадения результатов в лабораторных условиях. Вирус X был практически полностью выявлен методом ИХА, невыявленные 2 образца относятся в сорту Раменский, который полностью оказался поражен ХВК. Кроме этого ХВК был полностью выявлен с помощью ИХА в полевых условиях в клонах сортов Удача, Ладожский, Накра, Роко, Лорх, Голубизна. ХВК оказался самым распространенным вирусом среди обследованного материала.

МВК был дополнительно выявлен методом ИФА в одном клоне сорта Никулинский и в одном клоне сорта Голубизна, в этих же сортах МВК был обнаружен и иммунохроматографическим методом ранее в полевых условиях. В одном клоне сорта Раменский, свободном от МВК по ИХА этот вирус был обнаружен иммуноферментным анализом в послеуборочной пробе.

Вирус У в послеуборочных пробах был дополнительно обнаружен методом ИФА в клонах сортов Розара, Холмогорский и Ладожский. В клонах сортов свободных от УВК по результатам ИХА иммуноферментным анализом данный вирус также выявлен не был.

Характерно, что сорта клоны которых были полностью свободны от вирусов по результатам ИХА (Каратоп, Наяда, Ред Скарлет, Любава, Чародей, Ильинский) показали отсутствие вирусов и по результатам послеуборочного ИФА.

Отбор безвирусных растений на основании результатов полевого иммунохроматографического анализа у сортов Лорх, Накра, Роко, Удача, Невский позволила сохранить эти клоны в свободном от вирусов состоянии, что подтверждено результатом ИФА в глазковом тесте.

Таким образом, полевая диагностика на тест-полосках может успешно применяться при клоновом отборе в семеноводстве картофеля.

Другие возможные области применения метода

1. Полевая диагностика при проведении апробации
2. Экспресс-диагностика по росткам партий семенного материала при его купле-продаже
3. Независимая моментальная диагностика растительных образцов (как полевая, так и лабораторная) в спорных случаях, возникающих в процессе семеноводства.
4. Массовая диагностика растительных образцов при сертификации семенного материала (возможна в случае сопоставимости стоимости иммунохроматографического анализа с традиционным ИФА).
5. Применение на дачных участках и в личных подсобных хозяйствах.

ЛИТЕРАТУРА

Блинцов А.Н., Дрыгин Ю.Ф., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Осипов А.П., Атабеков И.Г. Инновационная технология экспресс-диагностики вирусных инфекций растений методом иммунохроматографии на тест-полосках. В кн.: Картофелеводство: результаты исследований, инновации, практический опыт. Материалы научно-практической конференции и координационного совещания «Научное обеспечение и инновационное развитие картофелеводства» / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. НИИ картоф. хоз-ва; под ред. Е.А.Симакова. – М., 2008. – Т.1. – с.290-297.

Дрыгин Ю.Ф., Блинцов А.Н., Осипов А.П., Григоренко В.Г., Андреева И.П., Усков А.И., Варицев Ю.А., Анисимов Б.В., Новиков В.К., Атабеков И.Г. Высокочувствительный иммунохроматографический экспресс-метод определения зараженности растений вирусом табачной мозаики. // Биохимия, 2009, том 74, вып.9, с.1212-1220.

Кравченко Д.В., Усков А.И., Варицев Ю.А. Инновационная технология диагностики вирусов картофеля методом иммунохроматографии на тест-полосках. В кн.: Перспективы инновационного развития картофелеводства. Материалы научно-практической конференции. – Чебоксары: КУП ЧР «Агроинновации», 2009, с.58-60.

Кравченко Д.В., Усков А.И., Варицев Ю.А., Овес Е.В. Возможности использования иммунохроматографических тест-систем для диагностики вирусов картофеля. В кн.: Картофелеводство: Сб. науч. тр. -ов. Материалы координационных и научно-практических конференций, посвященных 120-летию со дня рождения А.Г.Лорха / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. НИИ картоф. хоз-ва; под ред. Е.А.Симакова. – М., 2009. – с.208-213.

Подписано в печать 17.01.2011 г.

Усл. 1,8 п.л.

Заказ 920 Тираж 100

Печать ризографическая. ГНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха, п/о Красново,
Московской области