

ОСОБЕННОСТИ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ТЕСТИРОВАНИИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

**Бутенко К.О.^{1, 3}, Скурат Е.В.¹, Кондакова
О.А.¹, Варицев Ю.А.², Гаврюшина Е.С.¹,
Дрыгин Ю.Ф.^{1, 3*}, Атабеков И.Г.¹**

¹ ФГБОУ ВПО Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова

² ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха

³ ГАУ Научно-производственный центр
«Моссемпродтехкартофель»

* e-mail: drygin@belozersky.msu.ru

В лаборатории базовым методом диагностики вирусных инфекций является твердофазный иммуноферментный анализ - ИФА. Его модификации позволяют работать в широком диапазоне концентрации вируса из сока заражённых растений вплоть до нескольких нанограмм в миллилитре.



«Сэндвич» ИФА применяется в случаях, когда предполагается низкая концентрация вируса в пробе. Этот формат включает следующие стадии:

- 1) Иммобилизация специфических первичных антител на полистирольном планшете*.
- 2) Стадии отмывки и блокировки.
- 3) Внесение сока или экстракта исследуемого образца картофеля.
- 4) Инкубация с конъюгатами специфических антител, меченных ферментом.
- 5) Добавление хромогенного или флуоресцентного субстрата и проведение субстрат-ферментной реакции с регистрацией оптического сигнала на спектрофотометре.

* имеются зарубежные коммерческие наборы ИФА, в которых специфические антитела иммобилизованы на полистирольном планшете

Наиболее чувствительной диагностической технологией является полимеразная цепная реакция, с помощью которой можно определять десятки молекул вирусной РНК. В случае необходимости, возможно усиление чувствительности ПЦР для определения одиночных молекул вирусных РНК и ДНК.



Для практической **массовой** диагностики вирусных инфекций картофеля экономически целесообразно использовать двухэтапный подход:

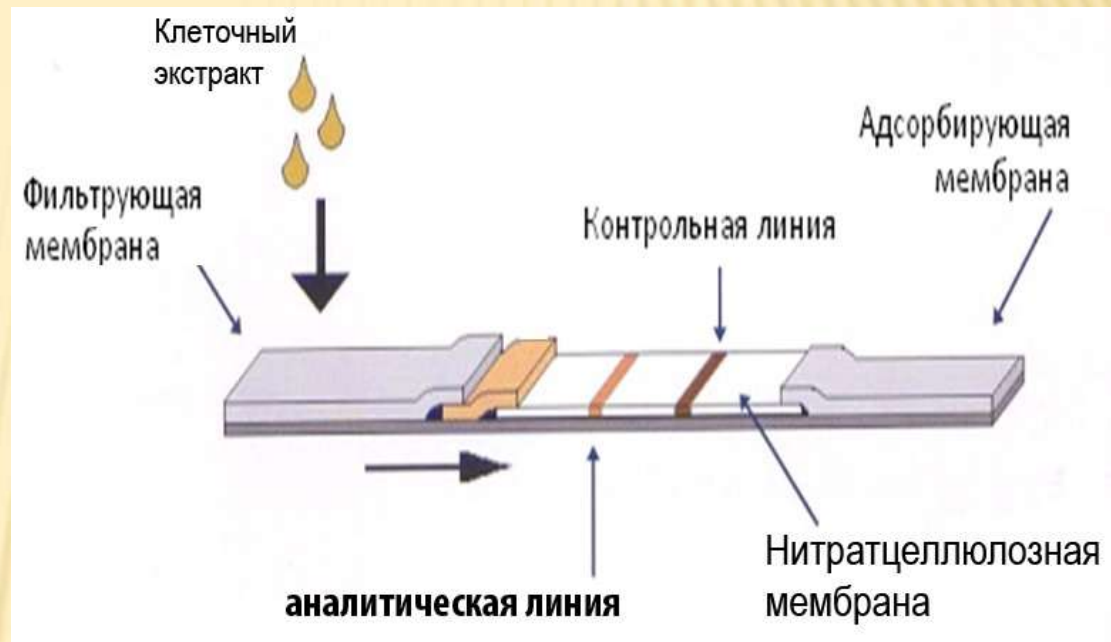
1) Сначала отбраковывают явно заражённый материал с помощью более дешёвых тестов – визуального теста и тест-полосок для иммунохроматографии.

2) Затем проводят подтверждение скрытой заражённости растений в лаборатории методами ИФА и, в некоторых случаях, ПЦР.

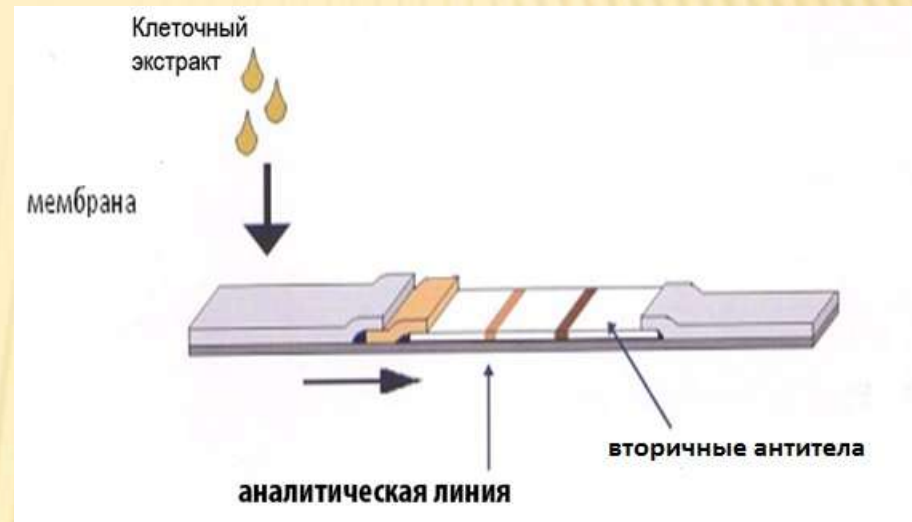


В основе иммунохроматографического метода лежит взаимодействие определяемого антигена с иммобилизованными на мембране антителами. В качестве метки использованы наночастицы золота, обладающие способностью отражать свет в видимой области спектра.

Основой устройства является узкая тест-полоска, состоящая из наклеенных на пластиковую подложку нескольких примыкающих друг к другу мембран, по которым движется поток жидкости, содержащей анализируемый образец.



На нитратцеллюлозной мембране в аналитической зоне иммобилизованы специфические антитела к определяемому антигену в виде узкой линии и на некотором расстоянии вторичные антитела - в виде второй, контрольной линии.

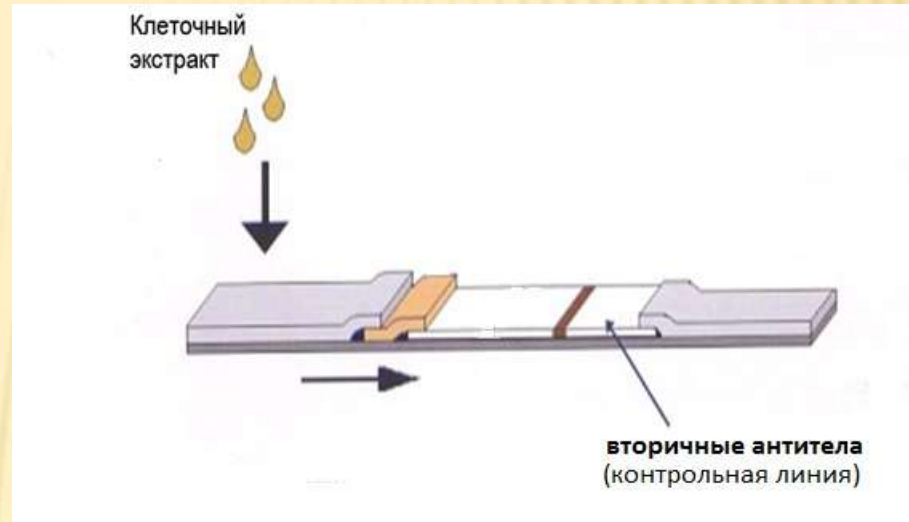


При погружении тест-полоски в исследуемый растительный экстракт или нанесении капли его на тест-полоску начинается его движение вдоль полоски под действием капиллярных сил. В присутствии вируса в образце, по мере продвижения его вдоль мембраны происходит образование иммунного комплекса вируса со специфическими антителами, мечеными наночастицами золота. Далее, достигнув аналитической зоны, иммунный комплекс связывается с иммобилизованными на мембране в виде линии специфическими антителами, и при концентрации вируса от 2 до 50 нг/мл наблюдается появление окрашенной полосы в аналитической зоне. Избыток несвязавшихся меченых антител мигрирует далее к контрольной зоне, где образуется вторая окрашенная линия.



При отсутствии вируса в исследуемом образце или при его концентрации менее 1-2 нг/мл меченные коллоидным золотом антитела задерживаются лишь вторичными антителами в контрольной зоне, что приводит к появлению только одной окрашенной контрольной линии.

Таким образом, наличие видимой окрашенной линии в контрольной зоне свидетельствует о правильном проведении теста.



Тест-полоски –это самый доступный экспресс-метод молекулярной диагностики вирусных инфекций.

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ ВИРУСОМ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ НА ТЕСТ-ПОЛОСКАХ С АНТИТЕЛАМИ К ХИМЕРНОМУ ВИРУСУ

Вирус скручивания листьев картофеля (ВСКЛ, син. L- вирус картофеля, potato leaf roll virus (PLRV)) вызывает одну из наиболее вредоносных болезней этой культуры и уступает только вирусу Y.

По литературным данным урожайность больных растений снижается на 38% – 70%.

Смешанные инфекции практически полностью подавляют рост картофеля.



Здоровое (сверху) и заражённое (внизу) ВСКЛ растения картофеля

В массовой молекулярной диагностике ВСЛК, как и других вирусов картофеля, применяется широкий набор методов и средств – от визуального осмотра растений до иммунохроматографических тестов на присутствие данного вируса в соке растений картофеля.

Трудность диагностики ВСЛК объясняется тем, этот вирус является флоэмно-ограниченным и сильно патогенным, и поэтому в зараженном растении вирусный антиген накапливается в маленьких количествах.

Выход природных изолятов этого вируса составляет всего 0,4-1,3 мг на 1 кг заражённого листового материала.

Низкий выход удорожает антисыворотку к вирусу и диагностику инфекции ВСЛК.

Нами была создана рекомбинантная ДНК, которая при агроинокуляции способна экспрессировать транспортный белок и РНК вируса табачной мозаики, в которой ген белка оболочки заменен на ген капсидного белка ВСЛК. При этом химерный вирус, состоящий из РНК ВТМ и белка оболочки ВСЛК (целевого антигена), инфекционен и вызывает системное заражение растения. В результате выход химерного вируса при выделении повышается почти в 1000 раз.

Важно отметить, что рекомбинантная РНК тобамовируса упаковывается капсидным белком в икосаэдрический вирион, в котором эпитопы белка оболочки имеют такое же пространственное расположение, как и у природного ВСЛК.

Количество выделенного «химерного» вируса, созданного по нашей технологии, составляет 20 мг из 25 г растительного материала.



белок оболочки ВСЛК

20 µl

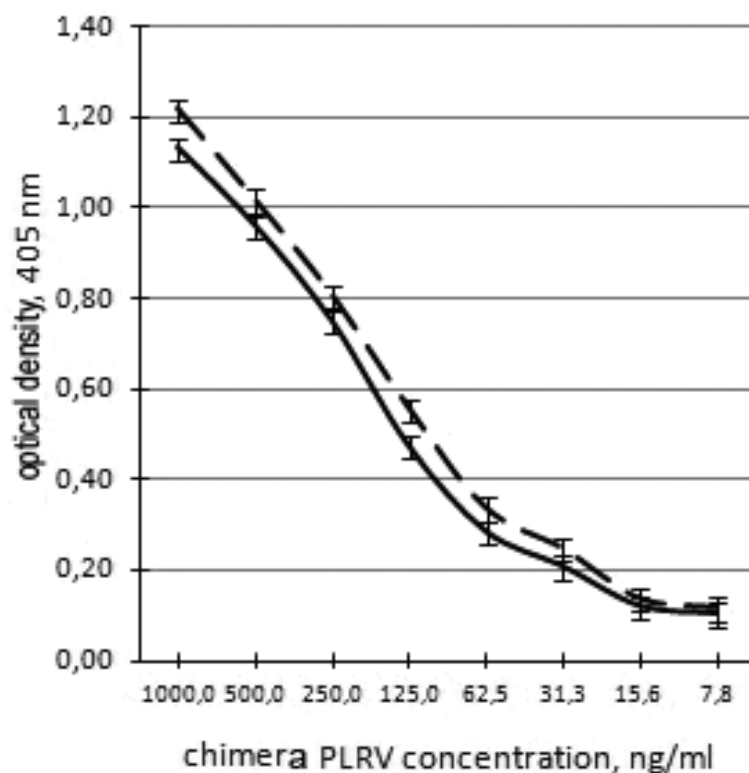
10 µl

5 µl

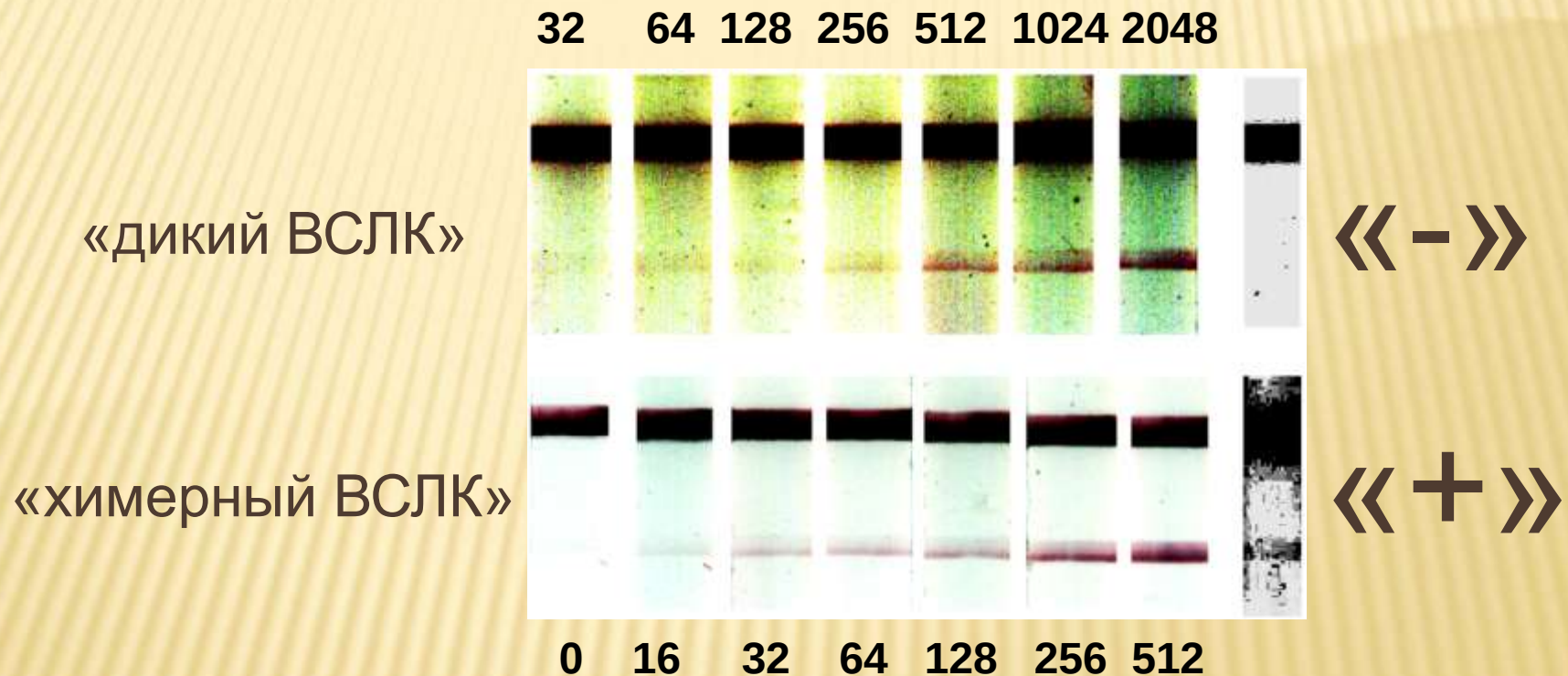
M

20 мг химерного вируса растворили в 3,5 мл буфера, и указанные аликвоты нанесли на гель.

Сравнение твердофазным сэндвич-ИФА графиков определения **ВСЛК** дикого типа (сплошная линия) и химерного (пунктирная линия) с помощью антител к химерному ВСЛК показало их идентичность.



Иммунохроматографические тесты, проведённые с помощью наших тест-полосок, позволяют проводить полевую диагностику заражения растений ВСЛК при концентрации вируса в пробе 30 и более нг/мл.



Иммунохроматографический метод является точным и гарантированным способом полевой оценки заражённости картофеля вирусами.

Этот метод доступен каждому картофелеводу задолго до лабораторной диагностики.