



Молекулярная диагностика возбудителей заболеваний картофеля

Владимир Карандашов, к.б.н.

**Руководитель лаборатории диагностики фитопатогенов
ООО «Исследовательский центр «ФитоИнженерия»**

Московская область, Дмитровский район, с. Рогачёво

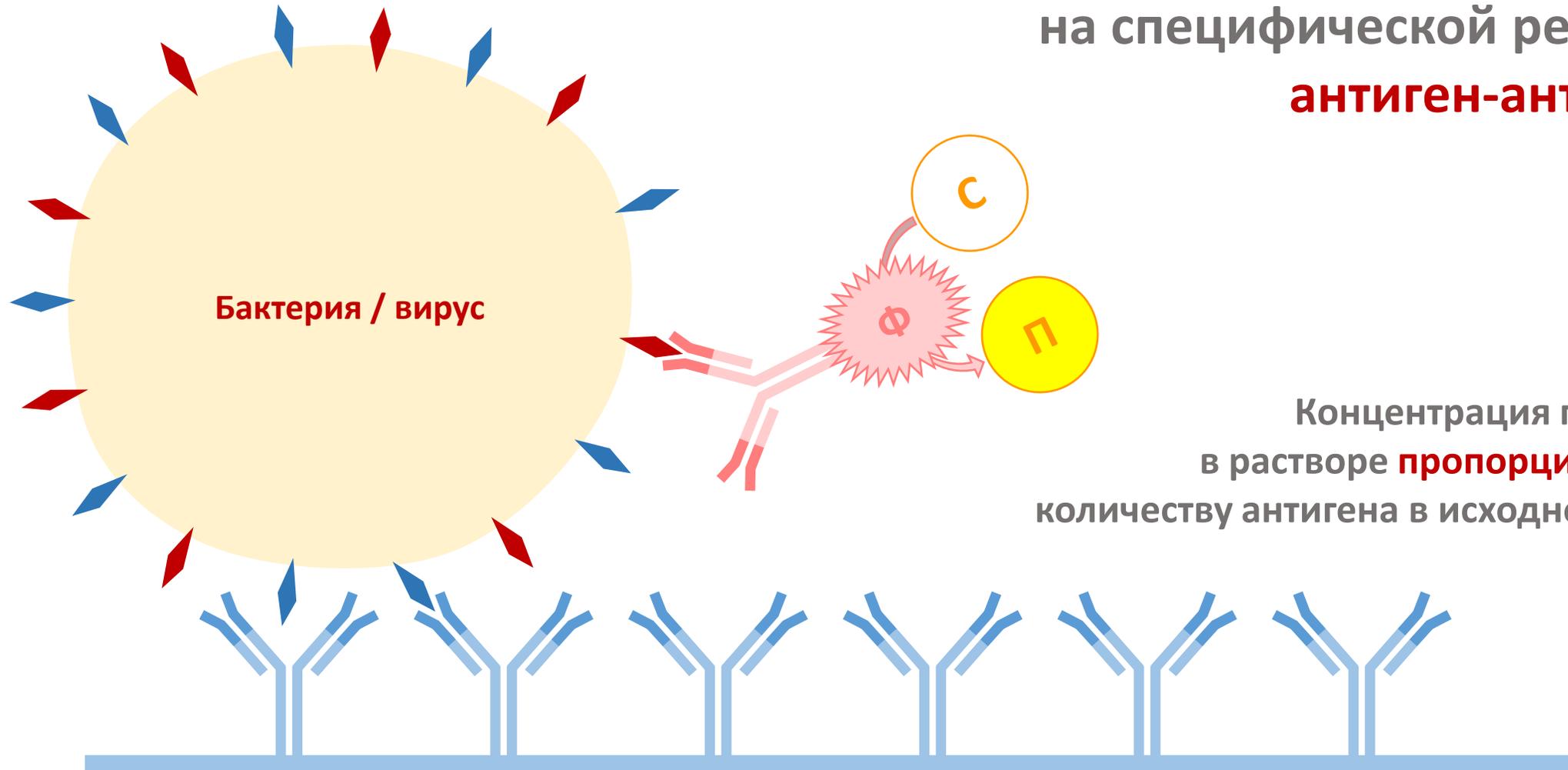
Биологический факультет МГУ, 28-29 марта 2014

Иммуноферментный анализ

Полимеразная цепная реакция

ИммуноФерментный анализ (ИФА)

Иммунологический метод, основанный
на специфической реакции
антиген-антитело

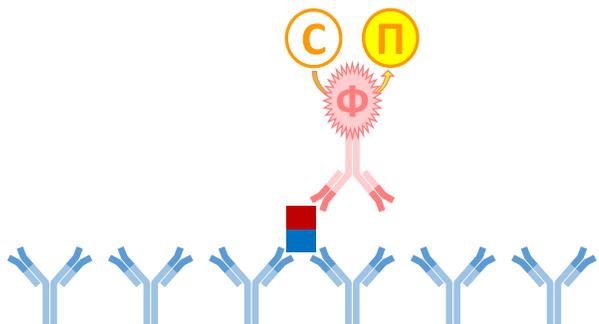


Концентрация продукта
в растворе **пропорциональна**
количеству антигена в исходной смеси

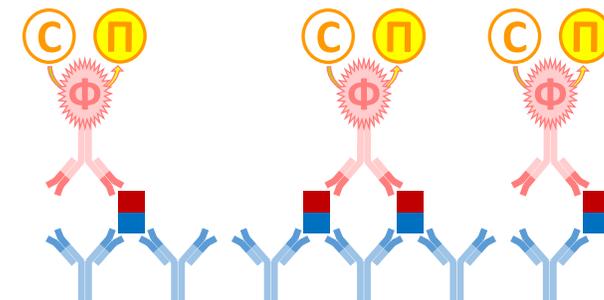
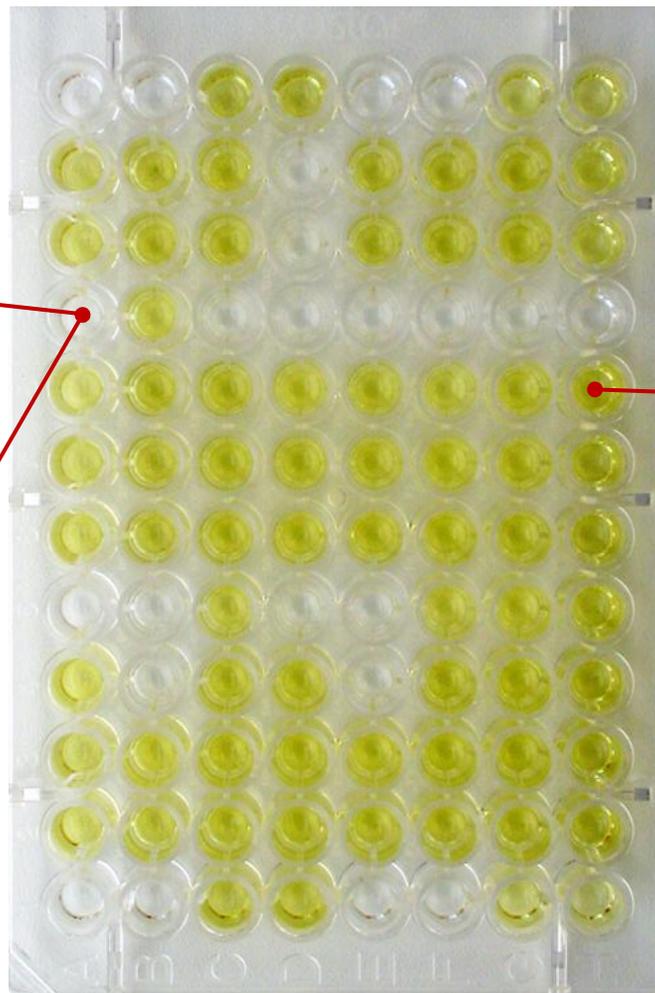
Интерпретация результатов ИФА



«-» контроль или
здоровый образец

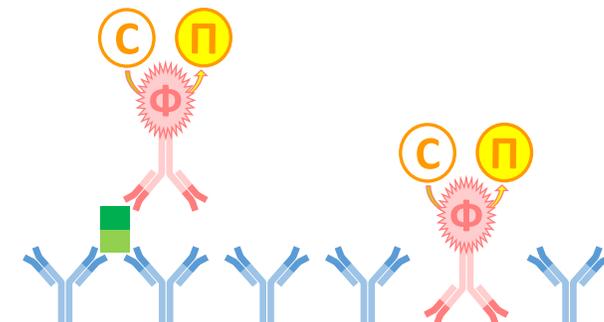


Слишком мало антигена

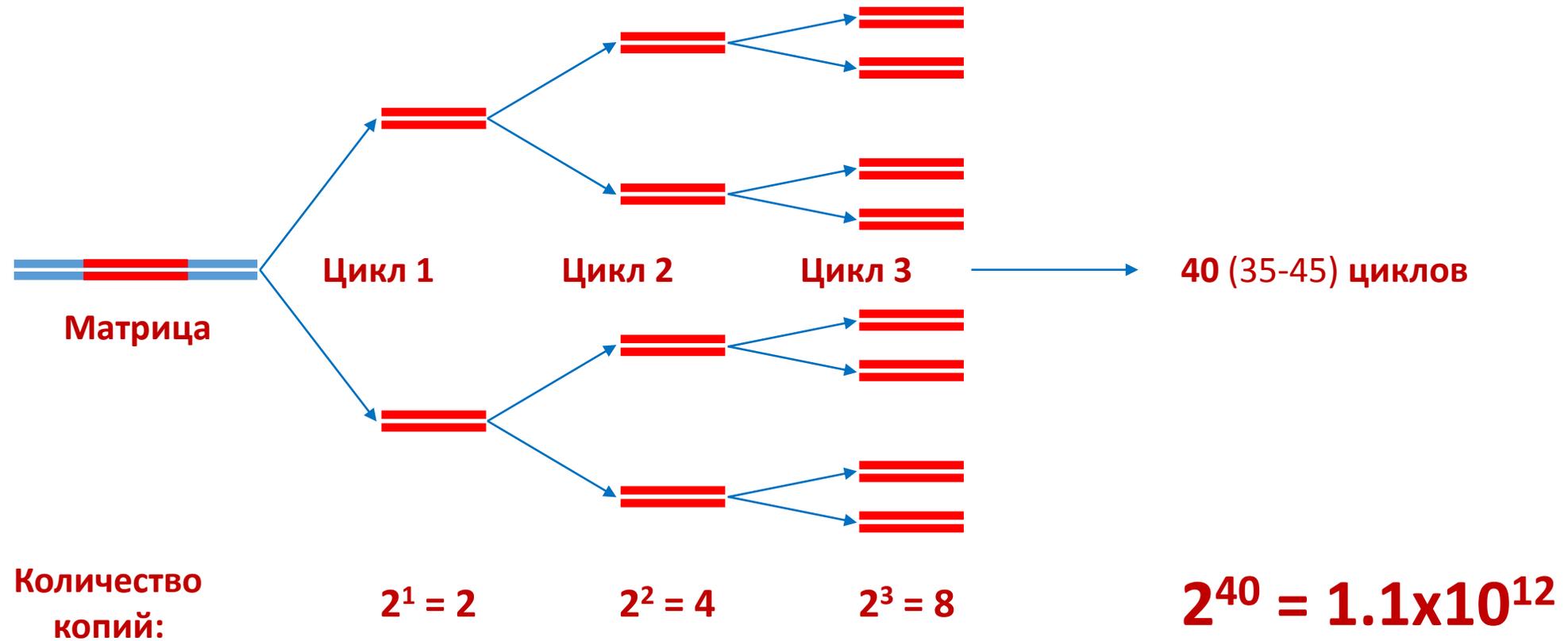


«+» контроль или
инфицированный образец

Неспецифическое связывание



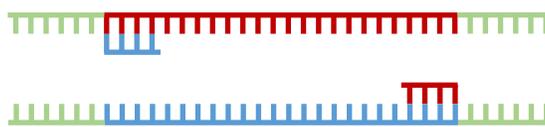
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



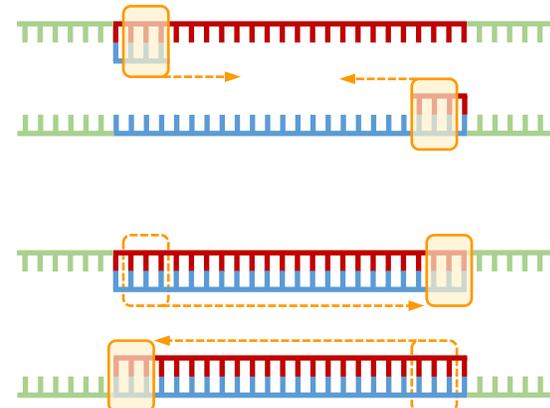
Экспоненциальное удвоение строго специфического фрагмента ДНК

Стадии ПЦР

Отжиг праймеров (55-65°C)

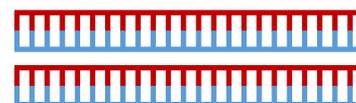
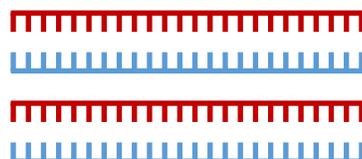
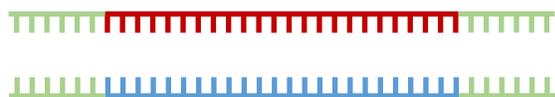


Полимеризация

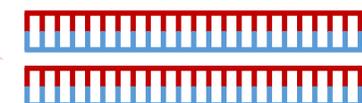


35-45 циклов

Денатурация (95°C)



Продукты (2ⁿ)



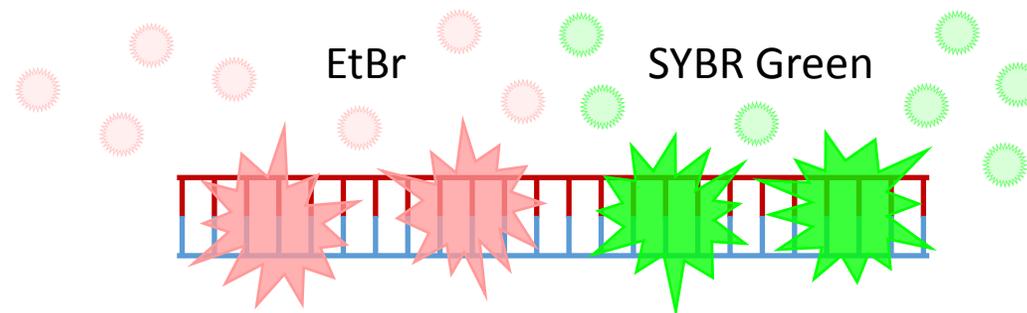
Детекция продуктов ПЦР

Традиционная ПЦР – ПЦР по конечной точке

Количество продукта оценивается по окончании реакции



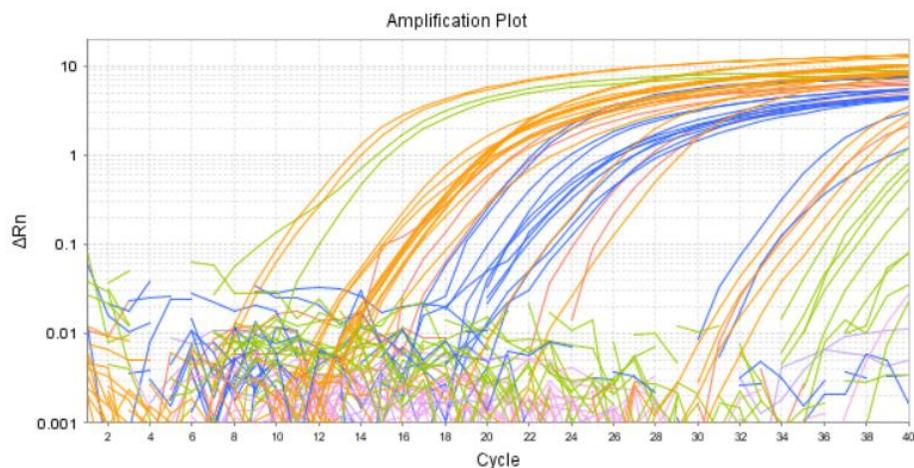
Интеркалирующие флуоресцентные красители



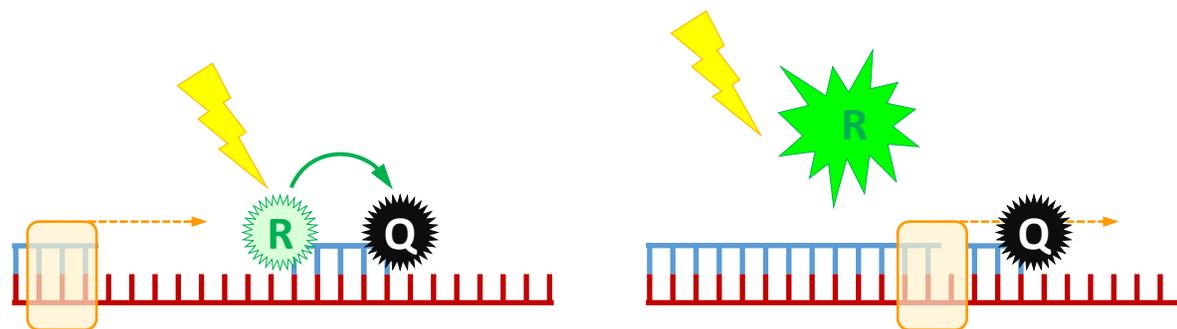
ПЦР в реальном времени - количественная ПЦР

Количество продукта оценивается в каждом цикле

Неспецифически связываются с любой двуцепочечной ДНК



Специфические зонды (TaqMan)

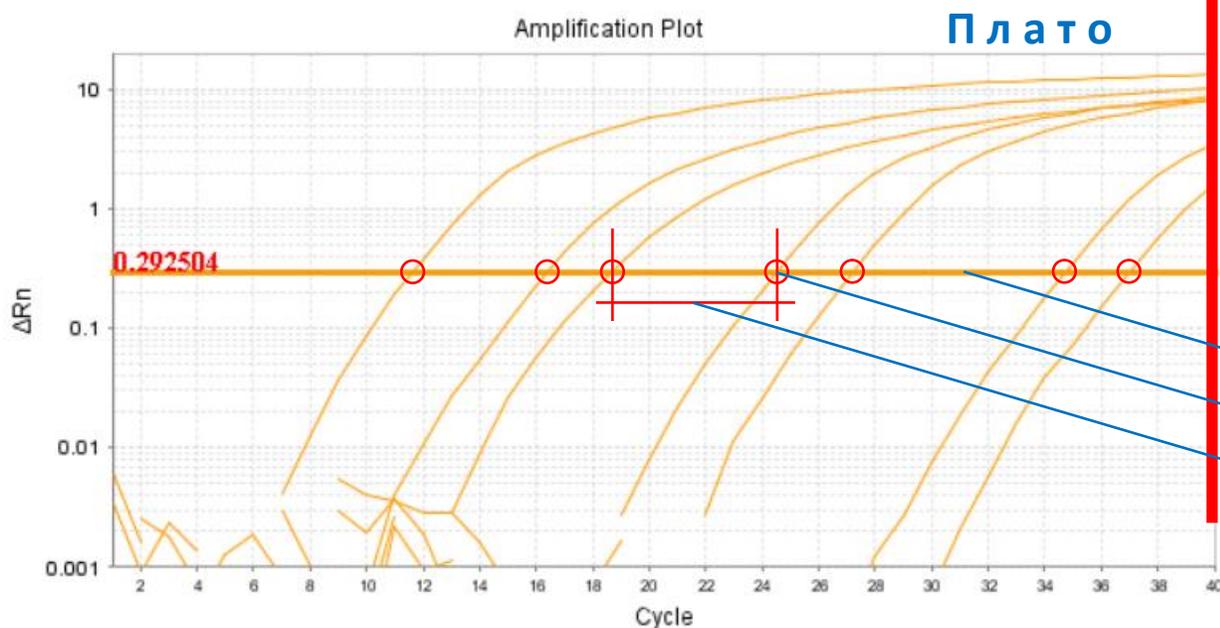


Образец	Ct	ΔCt	$\approx 2^{\Delta Ct}$
1	11,6		
2	16,3	4,7	26,3
3	18,6	7,0	125,0
4	24,5	12,9	7 408,7
5	27,2	15,6	48 543,8
6	34,7	23,1	9 103 563,8
7	37,0	25,4	43 034 787,2

ПЦР vs ПЦР-РВ



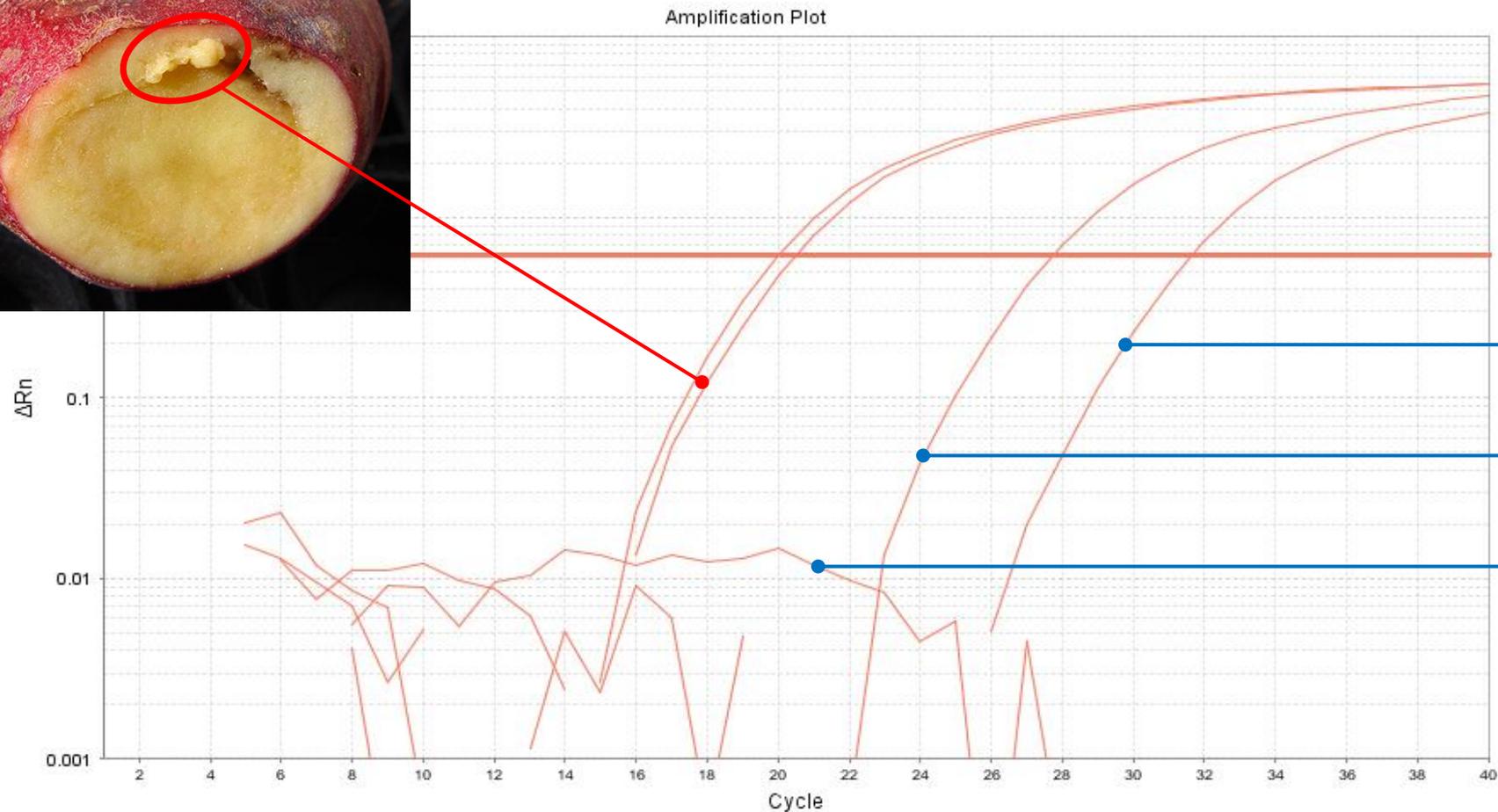
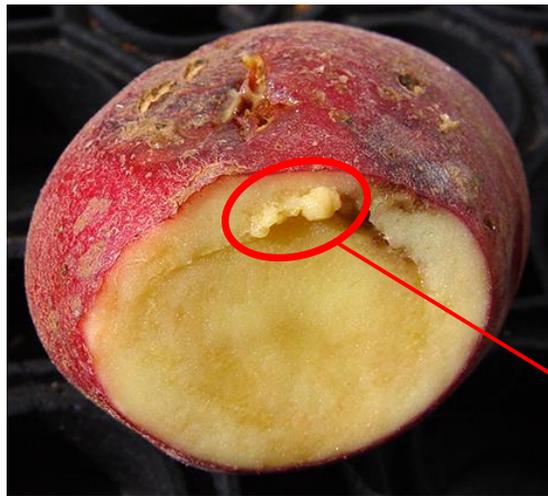
Результаты ПЦР по конечной точке после 40 циклов



Threshold / Порог
Ct
 ΔCt

Результаты ПЦР-РВ

Диагностика кольцевой гнили (*Cms*)



Образец – 200 клубней
Столонная часть
Элита – 0%
РС 1-2 – 0.5%
Европа - карантин

198 клубней без явных
симптомов заболевания

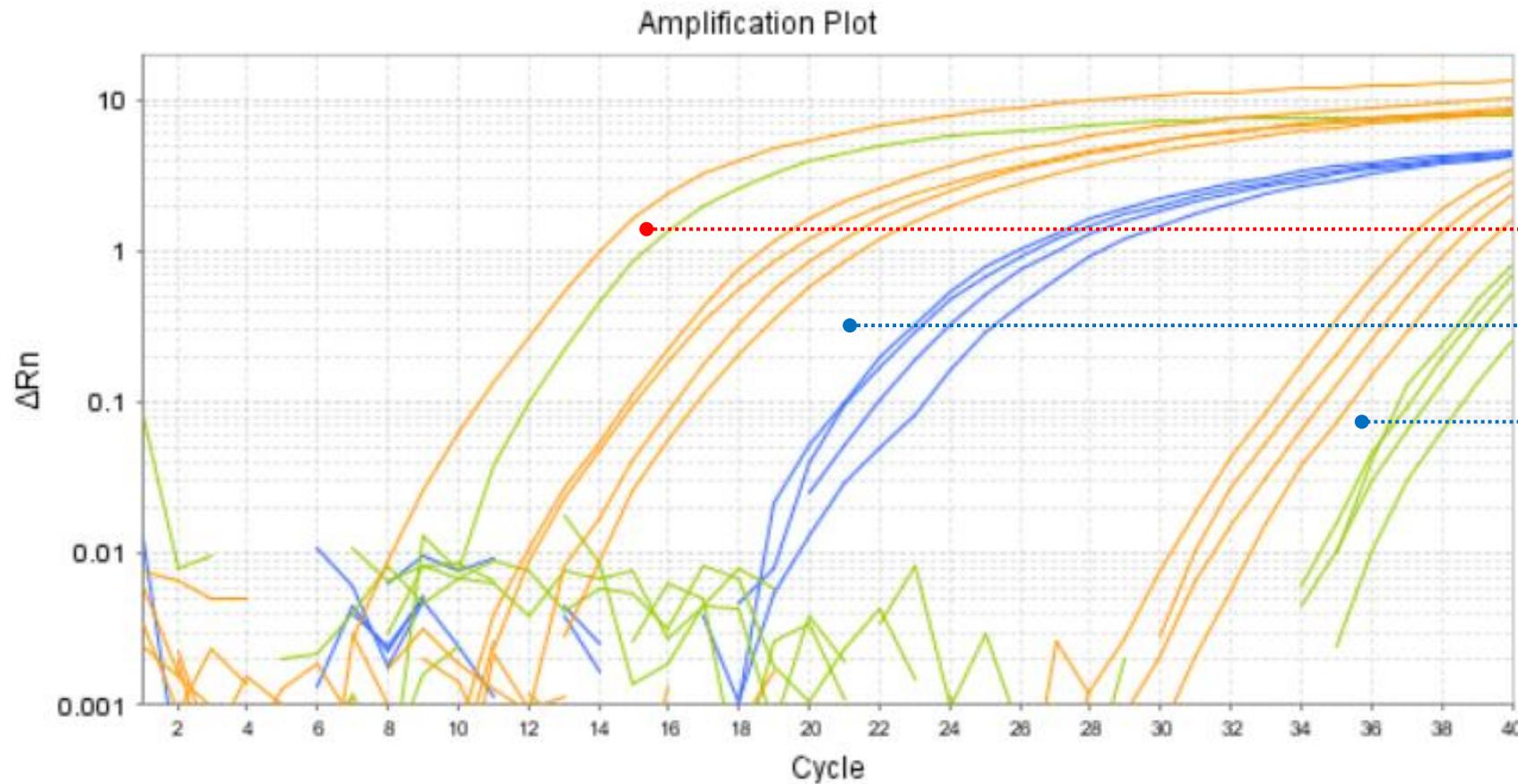
Положительный контроль

Отрицательный контроль

1
214
3185

Диагностика мокрой гнили и «чёрной ножки» (*Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp.)

Образец – 100 клубней, кожа
Элита – 1/0%, РС 1-2 – 1/1%



Положительный контроль
(чистая культура *D. solani*)

Образец №1

Образец №2

-  *Pectobacterium* spp. + *Dickeya* spp.
-  *Dickeya* spp.
-  *P. atrosepticum*

ИФА vs ПЦР

ИФА

Белок

Низкая чувствительность

Минимальная пробоподготовка

Специфичность антител

Невысокие требования к условиям проведения

ПЦР

Нуклеиновые кислоты

Высокая чувствительность

НК определённого качества (ингибирование реакции)

Качество реактивов и расходников (праймеры, зонды, полимеразы, пластик)

Строгие требования к условиям проведения

Диагностика в ИЦ ФитоИнженерия. Настоящее

Вирусы: Y, LR, X, S, M, A – **ИФА**, 100 клубней, 100x1 (1 клубень - 1 образец)

Бактерии:

Кольцевая (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) и бурая (*Ralstonia solanacearum*) гниль – **ПЦР-РВ** (TaqMan), 200 клубней, 1x200 или 2x100

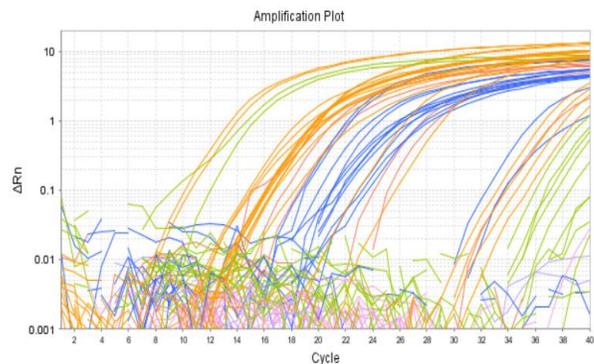
Мокрая гниль и «чёрная ножка» (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum*, *Dickeya* spp., *Dickeya solani*) – **ПЦР-РВ** (TaqMan), 100 клубней, 1x100 или **5x20** + культивирование бактерий на полуселективных средах

Подготовка образцов



Гомогенизация в запаянных пакетах полностью исключает кросс-контаминацию!

Схема проведения анализа



ПЦР-РВ



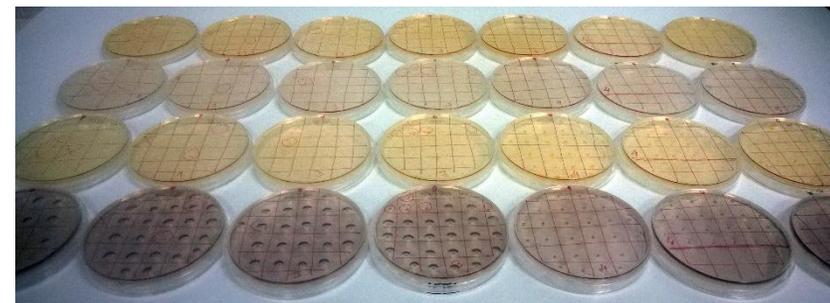
Модельные растения



Выделение ДНК



Криосохранение



Полуселективные среды

Строгое зонирование проведения работ

Пробоподготовка, выделение ДНК, микробиология, etc.

ПЦР 1
PCR ROOM 1

Мастер-микс +
праймеры + зонды

ПЦР 2
PCR ROOM 2

Добавление ДНК в РС

ПЦР 3
PCR ROOM 3

Проведение реакции

Электрофорез, клонирование, секвенирование, etc.

Организация ПЦР диагностики

Адекватный, обученный и ответственный персонал

Ограниченный доступ в зону «ПЦР 1»

Использование одноразовых стерильных наконечников с фильтром

Только «родной» пластик для проведения ПЦР

Регулярное автоклавирование дозаторов и штативов

Аликвотирование всех реактивов и воды

Обработка поверхностей средствами, разрушающими НК

Обязательное использование положительных и отрицательных контролей

Использование урацила и предобработка РС урацил-ДНК-гликозилазой

ПЦР ставится как минимум в двух независимых повторностях

Регулярная проверка качества ключевых реактивов

Регулярная проверка амплификатора

Сопоставление результатов ПЦР с результатами культивирования бактерий на полуселективных средах

Диагностика в ИЦ ФитоИнженерия.

Ближайшее будущее

Вирусы: Y, LR, X, S, M, A – **ПЦР** (сокращение сроков анализа в разы, РНК-вирусы, РНК – ОТ – ПЦР-РВ)

Бактерии:

Кольцевая (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) и бурая (*Ralstonia solanacearum*) гниль – **ПЦР-РВ** (TaqMan), **100/200/n** клубней, **nхn**

Мокрая гниль и «чёрная ножка» (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum*, *Dickeya* spp., *Dickeya solani*) - **ПЦР-РВ** (TaqMan), **100/n** клубней, **nхn**

Оснащение роботом для выделения НК

Секвенирование, инокуляция модельных растений (Смс / баклажан)

Спасибо за внимание!