

Четвертая научно-практическая конференция
**"ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И АГРОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО И ТЕХНИЧЕСКОГО КАРТОФЕЛЯ"**
Москва, 28-29 марта 2014 г.

**Разработка мультипараметрических
иммуноаналитических
тест-систем для выявления скрытой
зараженности картофеля вирусными и
бактериальными патогенами**

Сафенкова И.В., Панкратова Г.К., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

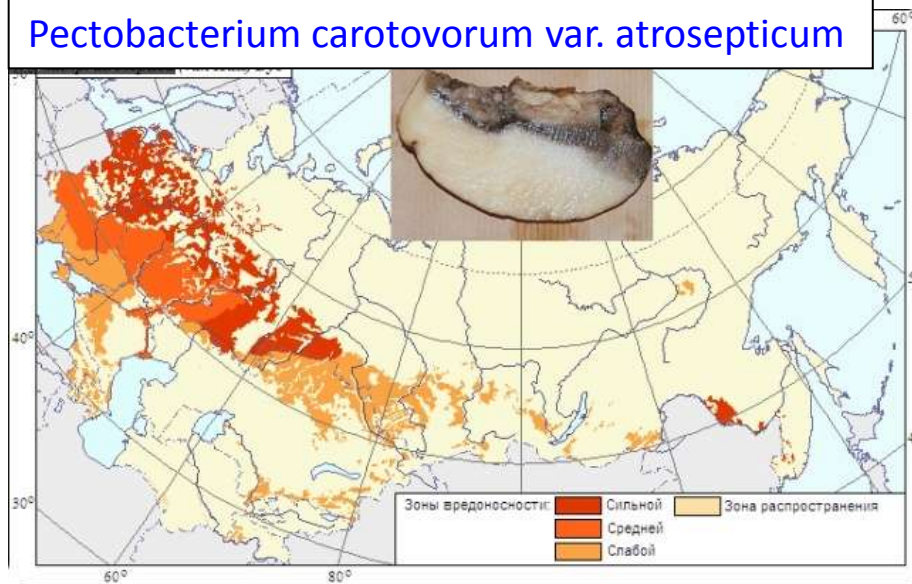
Зайцев И.А., Варицев Ю.А., Усков А.И.

ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха

Болезни картофеля

Черная ножка

Pectobacterium carotovorum var. *atrosepticum*



Pectobacterium carotovorum var. *carotovorum*

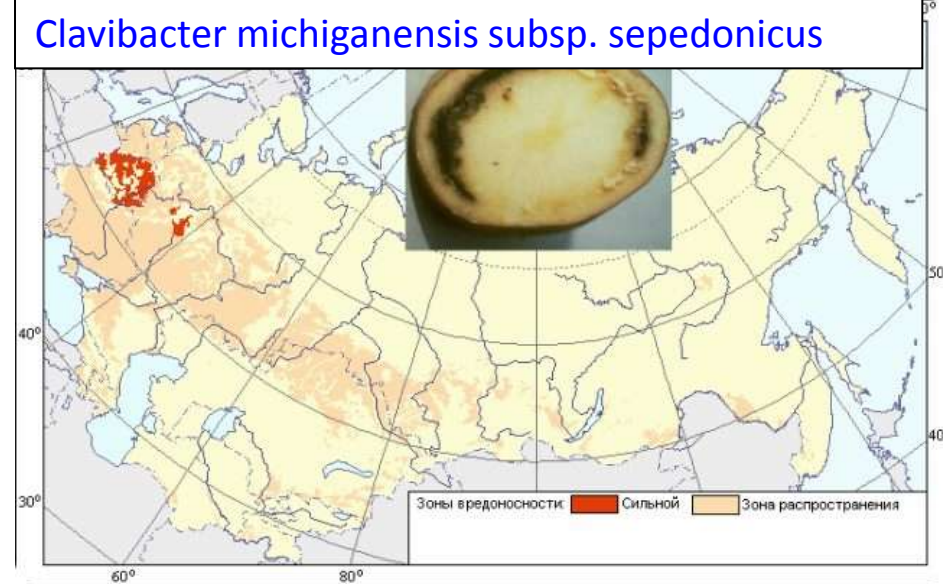
Erwinia chrysanthemi (*Dickeya dianthicola*)

Вредоносность: сгнивание семенных клубней после посадки, гибели растений в период вегетации, гнили клубней в поле и во время хранения.

Прямые **потери урожая** клубней достигают **15–20%**.

Кольцевая гниль

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*



Вредоносность: гниение клубней во время хранения урожая, поражении растений во время вегетации и заражении посадочных клубней. Наибольший вред наносится урожаю, помещенному в хранилища.

Прямые **потери урожая** клубней достигают **15–30%**.



Инфекционные болезни картофеля

Потери урожая до 50%

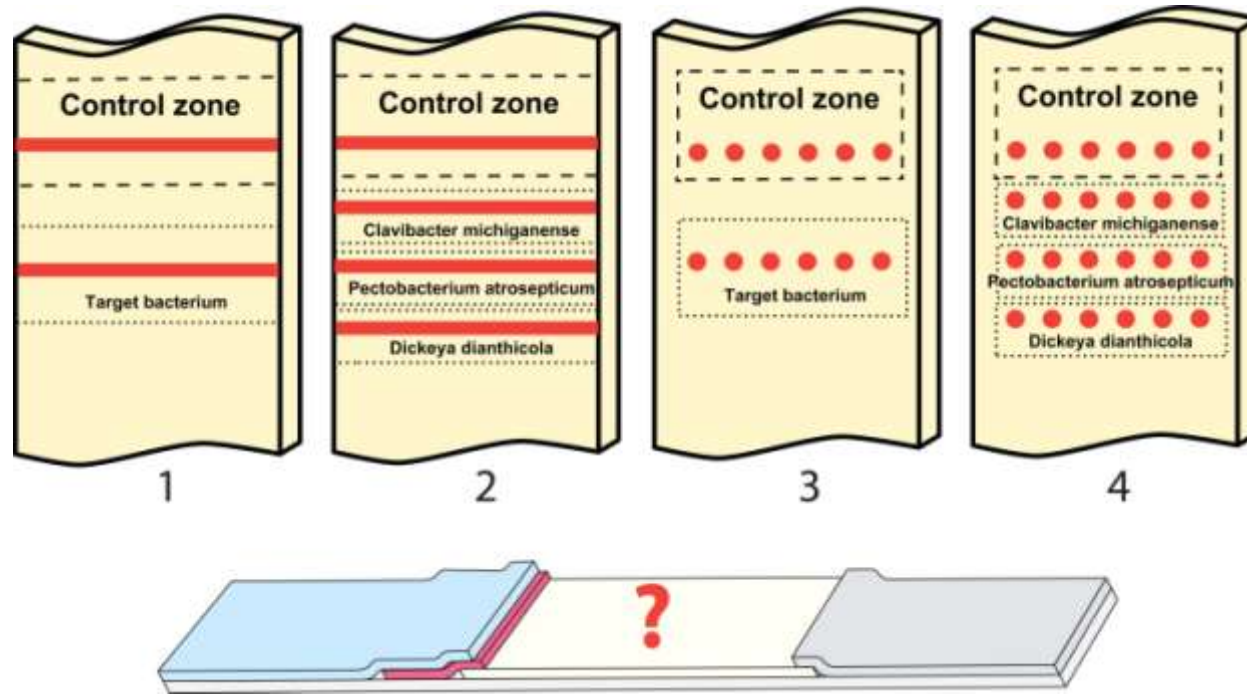
Необходимость диагностики

Актуальность быстрой и высокочувствительной
диагностики

Иммунохроматографический анализ

Мультипараметрический иммунохроматографический
анализ с одновременным выявлением нескольких
фитопатогенов

Основные требования к современным аналитическим методам



- Чувствительность
- Специфичность
- Простота проведения
- Экспрессность
- Визуальная оценка результатов
- Высокая производительность
- Количественная оценка результатов

ЦЕЛЬ: Разработка технологии получения **мультипараметрической иммунохроматографической тест-системы** для одновременного экспрессного выявления нескольких патогенов картофеля

Контролируемые патогены картофеля

- X-вирус картофеля (ХВК)
- S-вирус картофеля (SBK)
- A-вирус картофеля (ABK)
- M-вирус картофеля (МВК)
- Обычный штамм Y-вируса картофеля (Y⁰ВК)
- Некротический штамм Y-вируса картофеля (Y^N ВК)
- Вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК)
- *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicus* (Cms)
- *Pectobacterium atrosepticum*
- *Dickeya dianthicola*



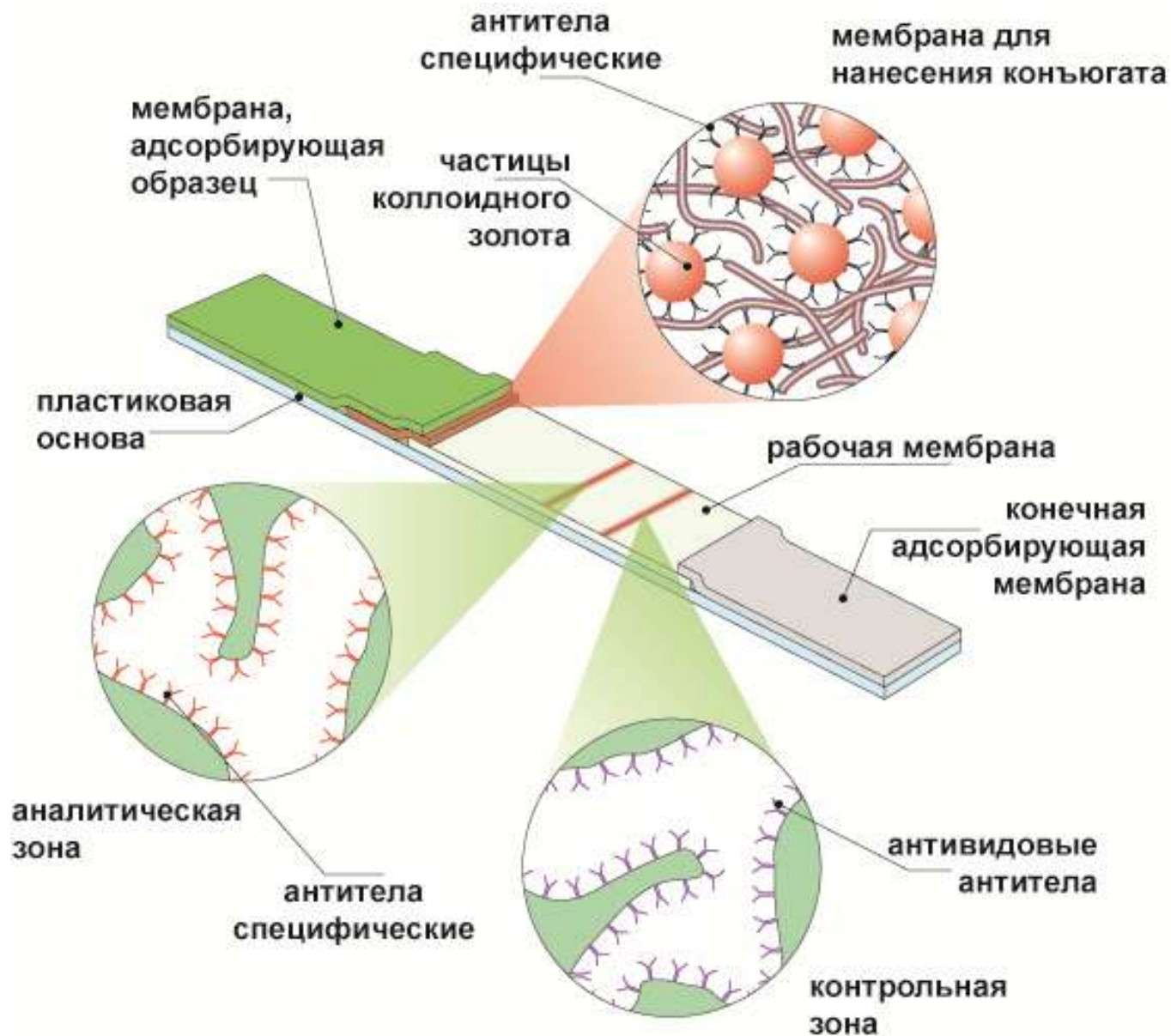
Вирус скручивания
листьев
картофеля



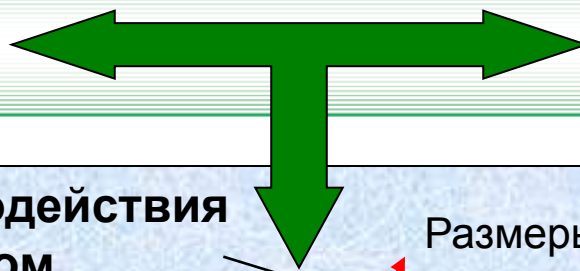
Y-вирус картофеля
вызывает
полосчатую и
морщинистую мозаику

Иммунохроматографическая тест-система

Полосочный формат



ТЕОРИЯ



ПРАКТИКА

Характеристика взаимодействия антител с фитопатогеном

Равновесные константы взаимодействия

Кинетические константы взаимодействия

Единичные взаимодействия

Характеристика взаимодействия антител на поверхности НКЗ

Константы взаимодействия молекул с поверхностью НКЗ

Гидродинамические условия, в которых взаимодействуют иммунообъекты

Параметры мембран

Условия проведения взаимодействий

Тип растительного матрикса

Размеры наночастиц синтезируемого коллоидного золота

Соотношение антитело/наночастица в конъюгате

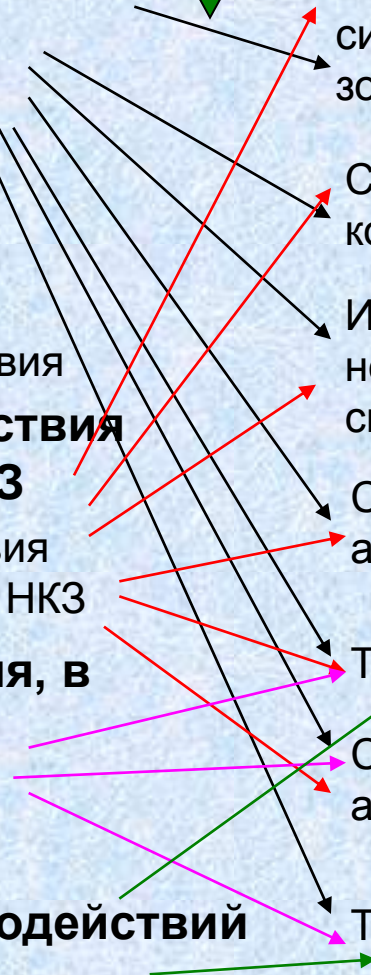
Использование одного или нескольких типов антител для синтеза конъюгата

Способ иммобилизации антител на поверхности НКЗ

Тип мембраны

Способ иммобилизации антител на мембране

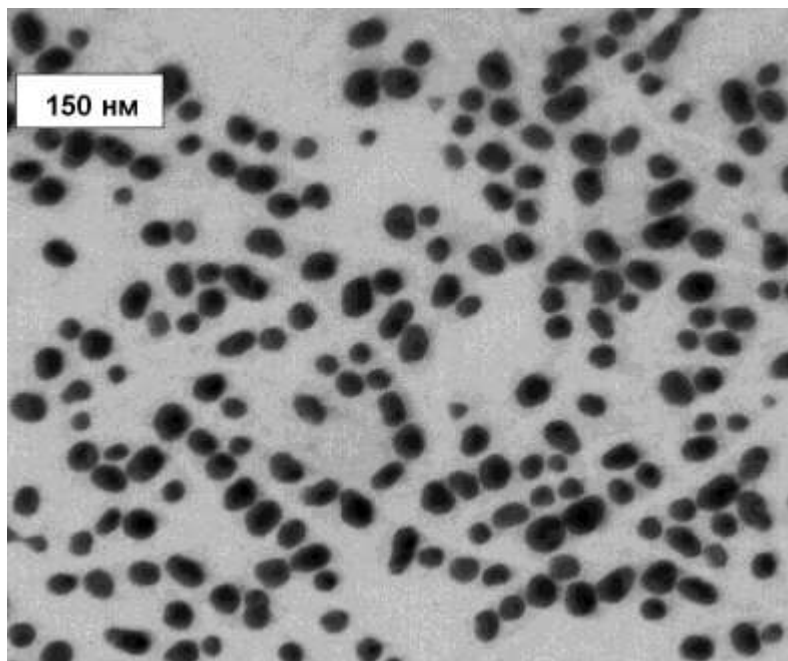
Тип экстрагирующего буфера



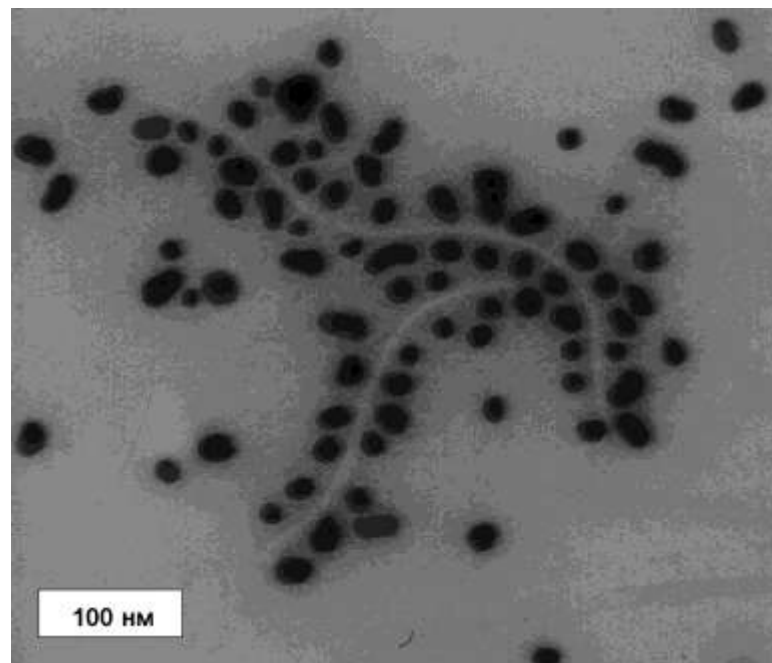
✓ *Простые критерии скрининга реагентов для иммуноаналитического применения?*

Синтез и характеристика наночастиц коллоидного золота (НКЗ) и конъюгатов антител с НКЗ

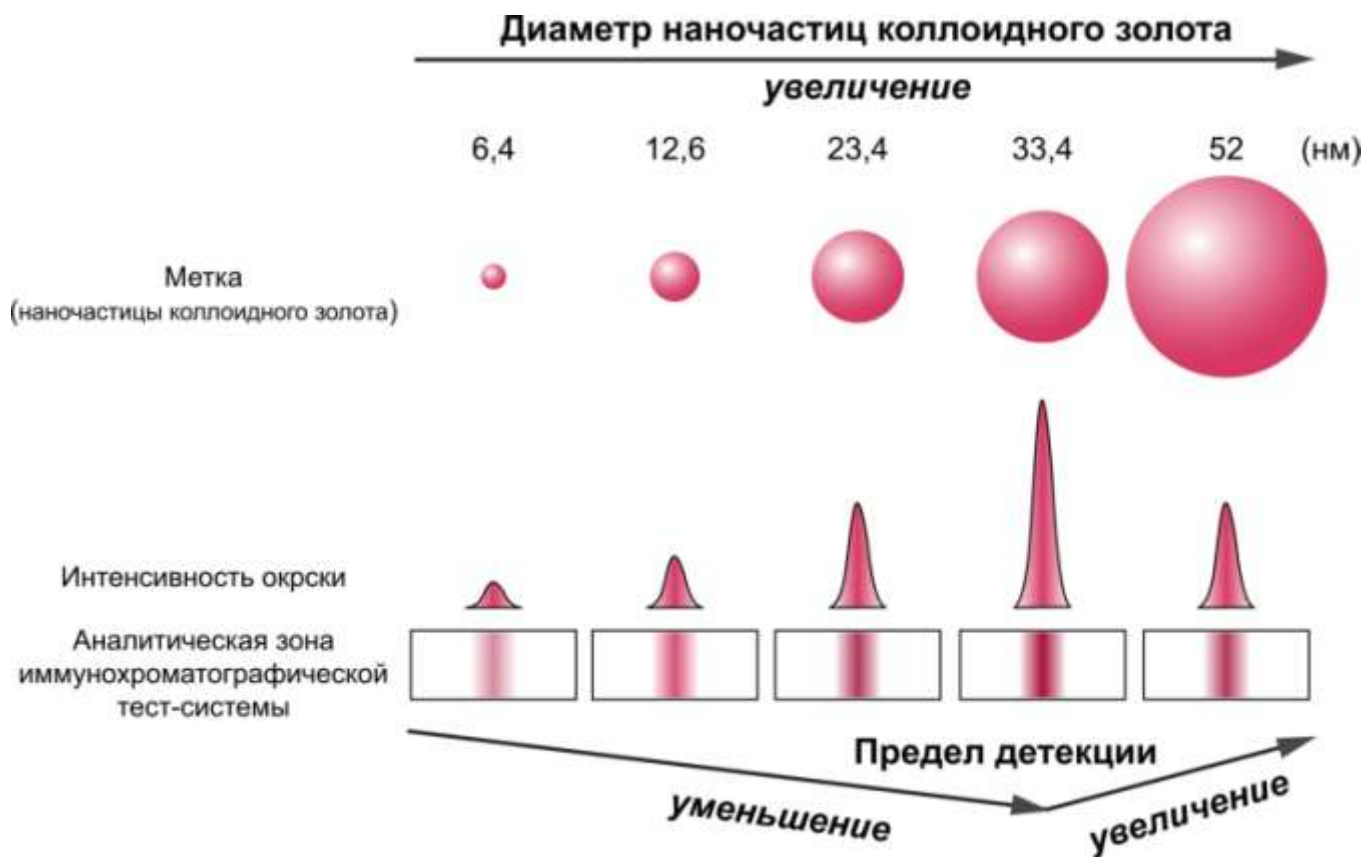
Фотография препарата НКЗ



Комплекс вируса и конъюгата
коллоидного золота
с моноклональными антителами



Влияние размера наночастиц коллоидного золота на предел детекции иммунохроматографической тест-системы



Увеличение диаметра наночастиц коллоидного золота (от 6,4 до 33,4 нм) приводит к уменьшению предела обнаружения от 80 до 3 нг/мл

Иммунохроматографическое определение вирусов В буфере экстрактах растений



2.3×10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3

Экстрагирующий буфер
+ *Dickeya dianthicola*



10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4

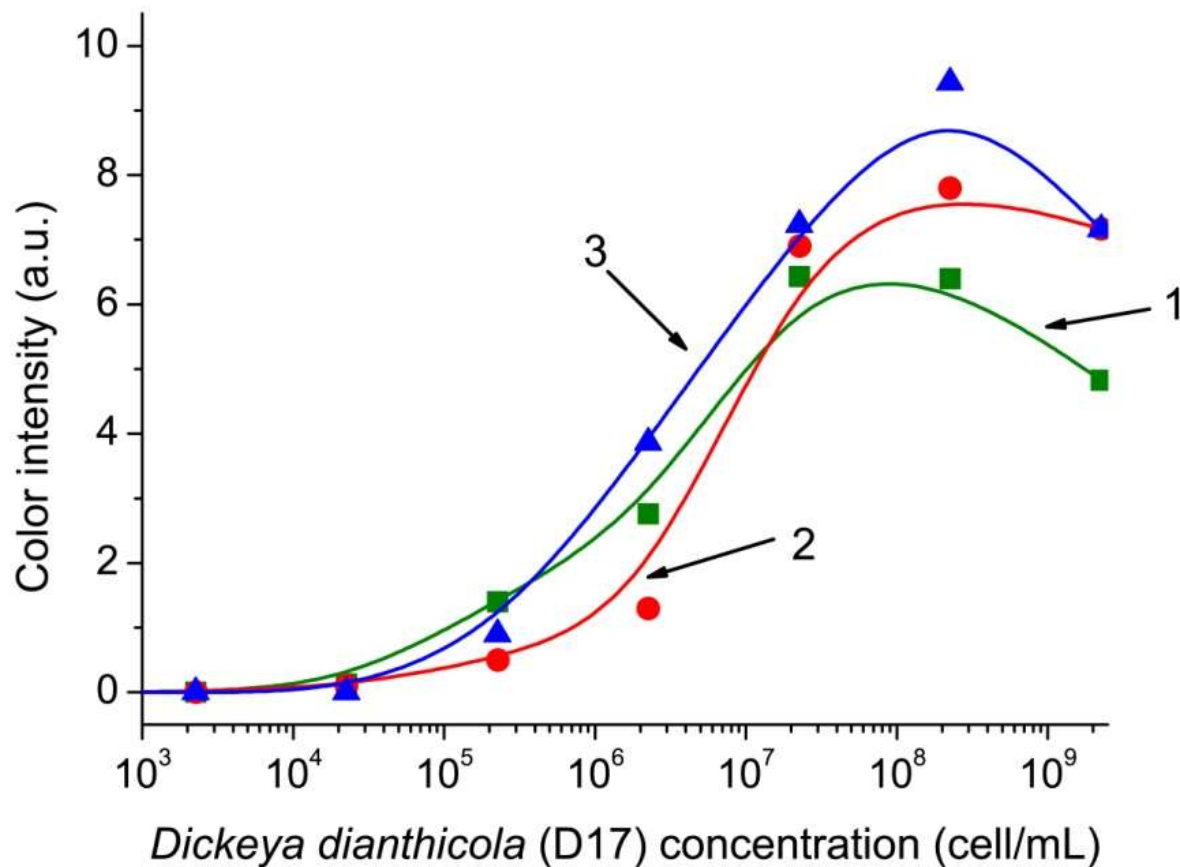
Экстракт из клубней
+ *Dickeya dianthicola*



10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 cell/mL

Экстракт из листьев
+ *Dickeya dianthicola*

Иммунохроматографическое определение вирусов В буфере экстрактах растений

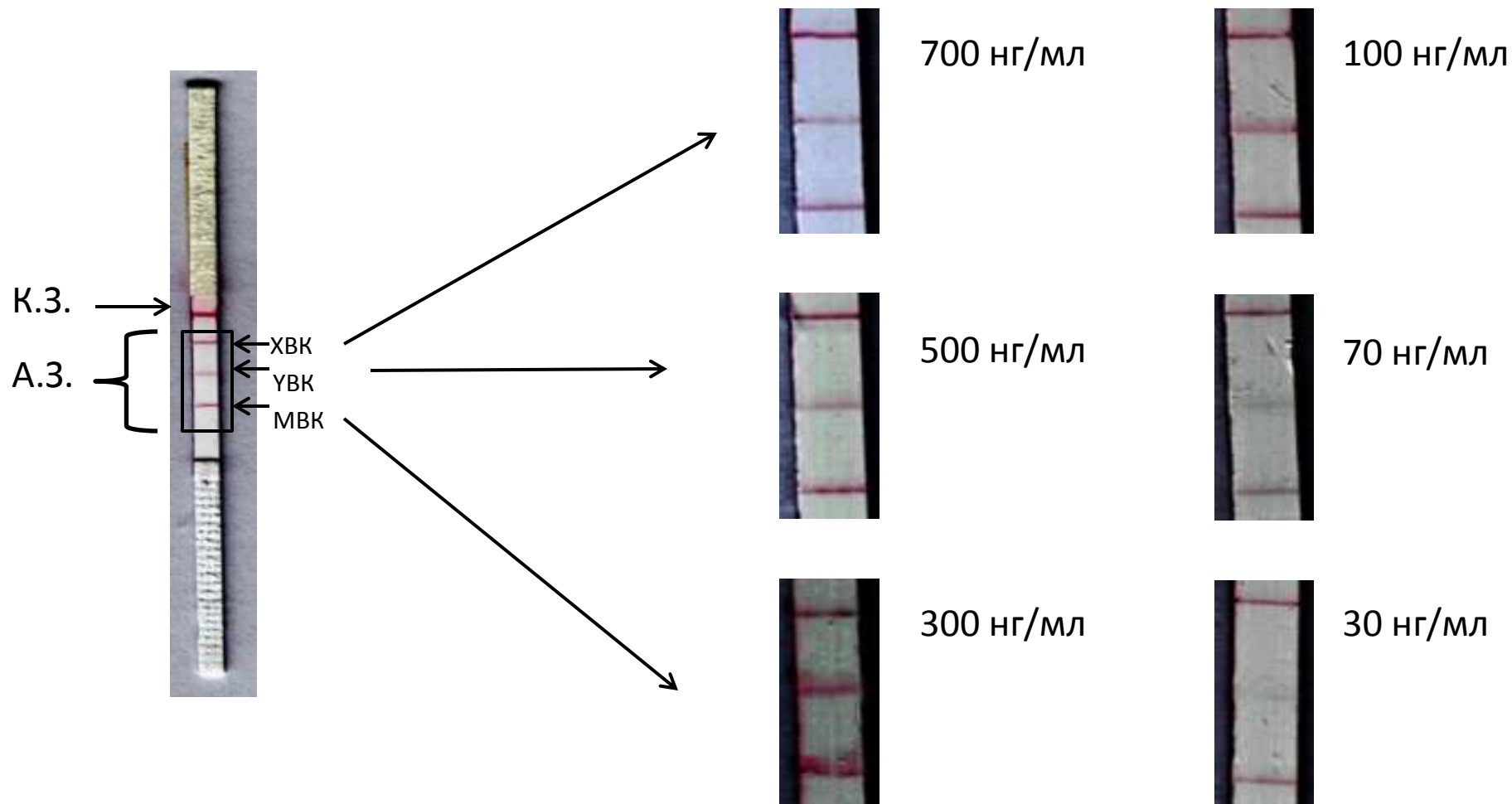


1 – Экстрагирующий буфер
+ *Dickeya dianthicola*

2 – Экстракт из клубней
+ *Dickeya dianthicola*

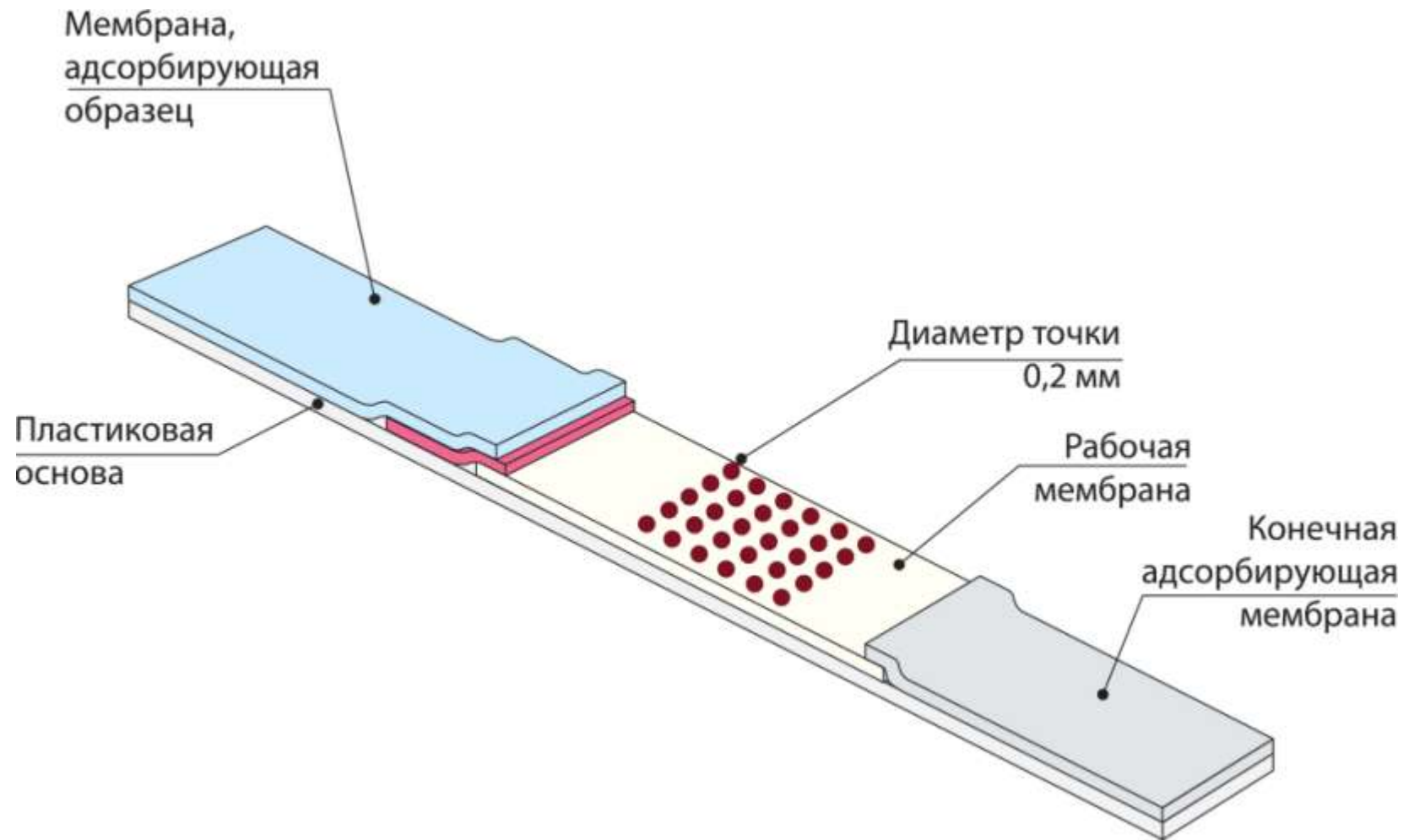
3 – Экстракт из листьев
+ *Dickeya dianthicola*

Мультипараметрические тест-системы в полосочном формате

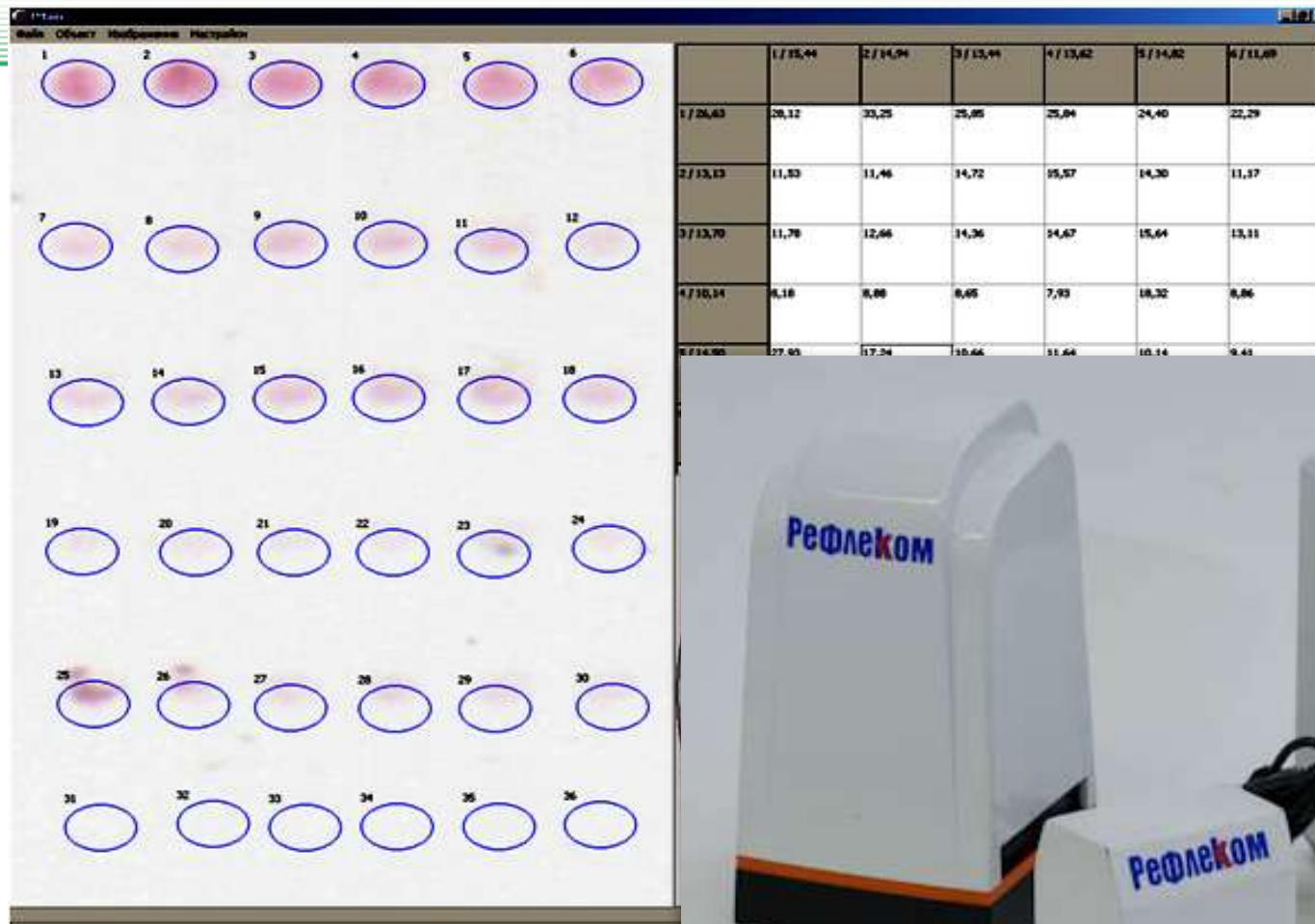


Иммунохроматографическая тест-система

Точечный формат



Видеорегистрация результатов анализа

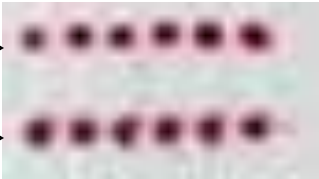


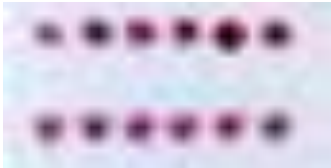
Программное обеспечение
для обработки данных
иммунохроматографического
анализа



Портативные видеорегистраторы для
количественной оценки результатов

Монопараметрические тест-системы в точечном формате на примере определения Х-вируса картофеля

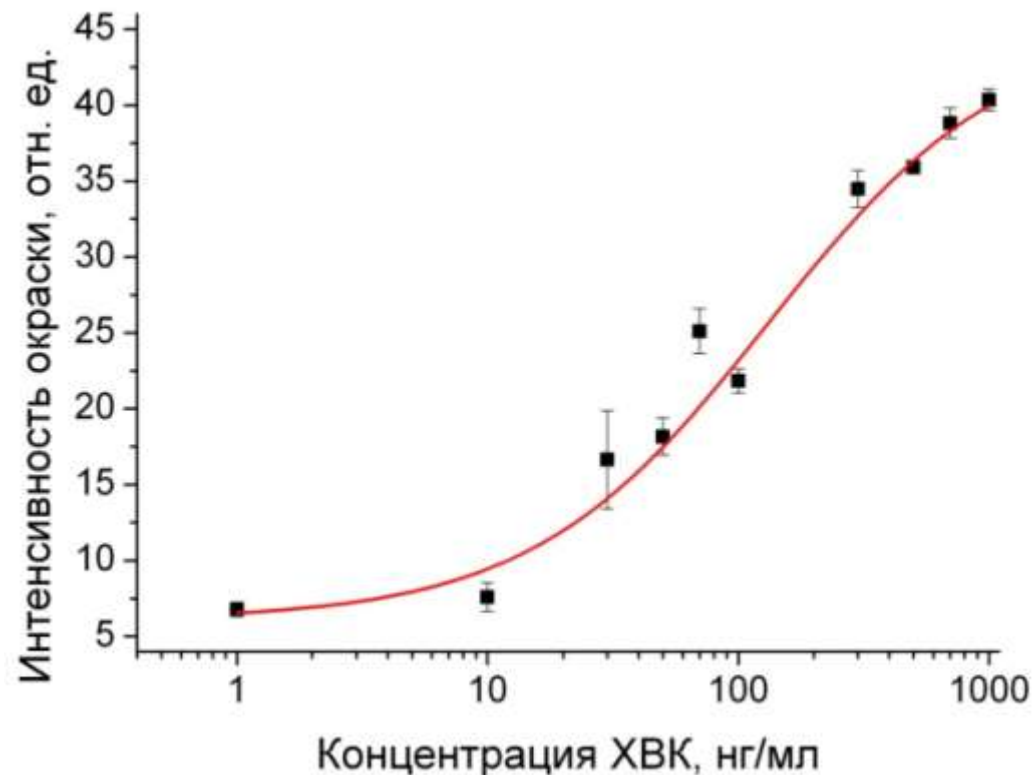
К.З. →  500 нг/мл
А.З. → 

  100 нг/мл

 50 нг/мл

 10 нг/мл

 1 нг/мл



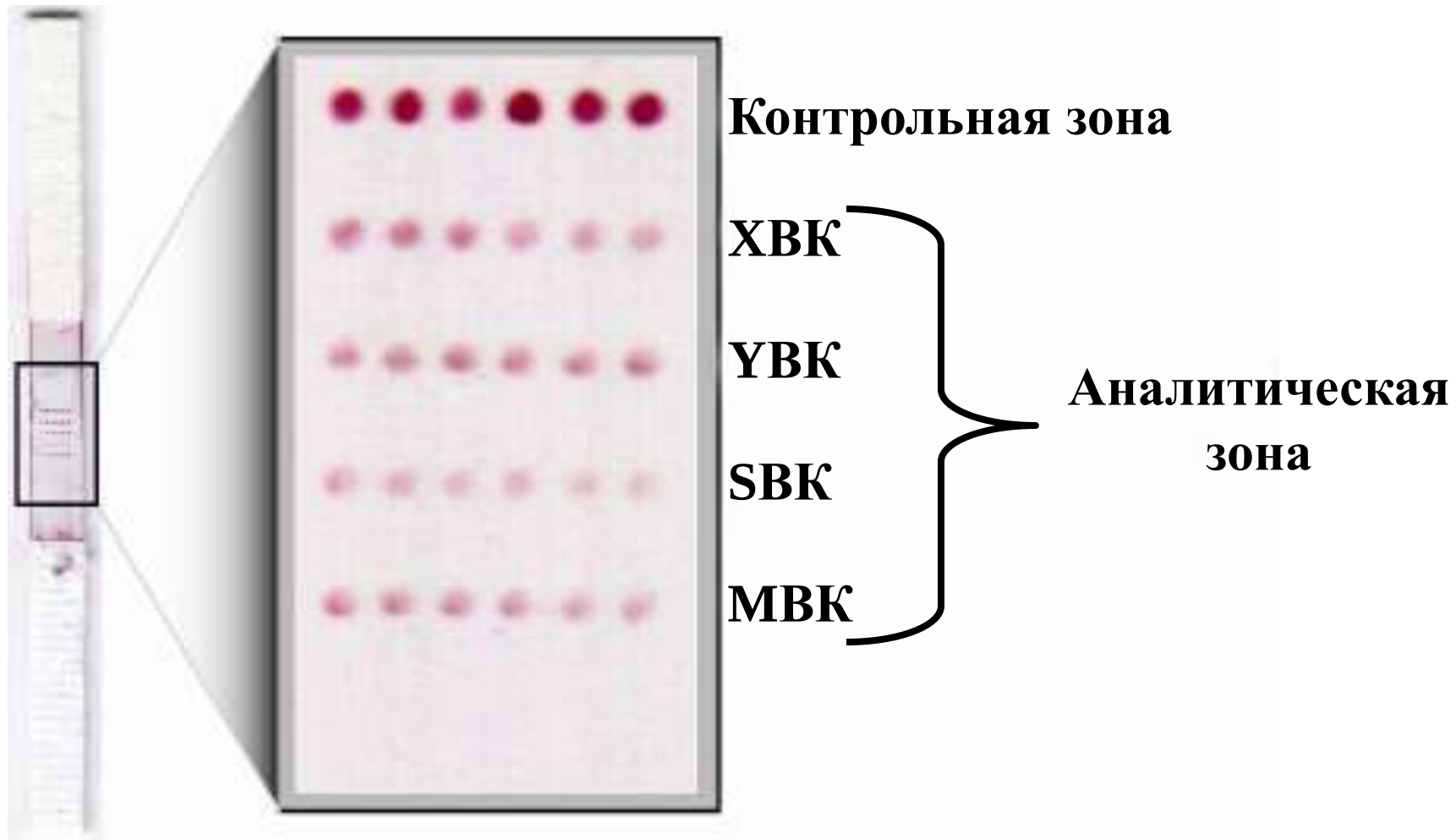
Пределы обнаружения патогенов в монопараметрической тест-системе в точечном формате

Пределы обнаружения :

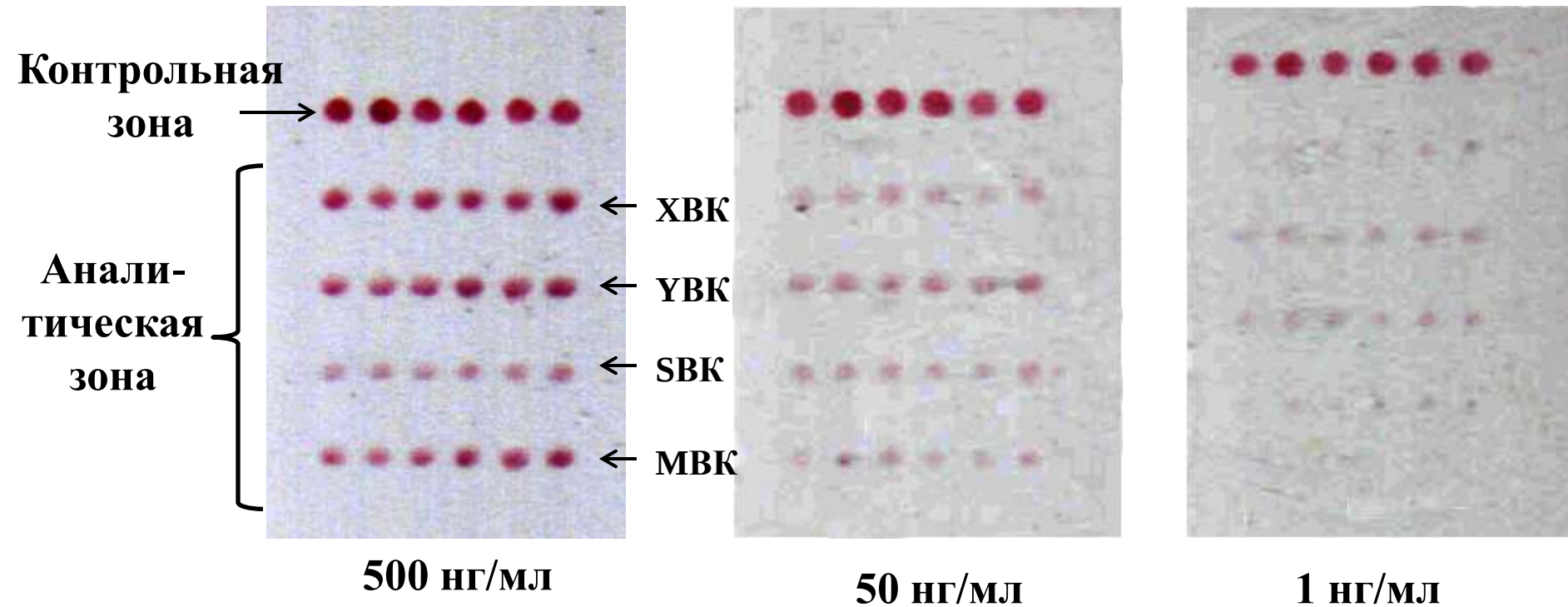
- ХВК, Y^NВК, Y^OВК и ВСЛК – 1 нг/мл,
 - МВК – 10, SBK – 100 нг/мл,
 - Cms – 10⁴ кл/мл,
- Pectobacterium atrosepticum – 5x10⁴ кл/мл,
- Dickeya dianthicola – 2x10⁴ кл/мл

Монопараметрические тест-системы в точечном формате по чувствительности не уступают ни полосочному иммунохроматографическому анализу, ни иммуноферментному анализу

Мультипараметрическая тест-система в точечном формате

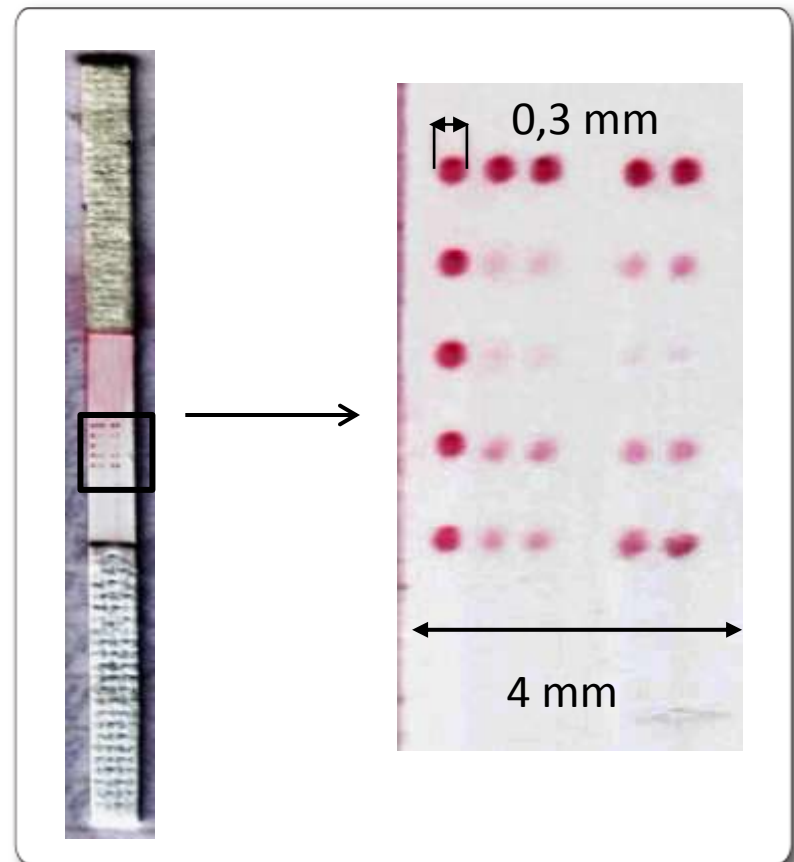
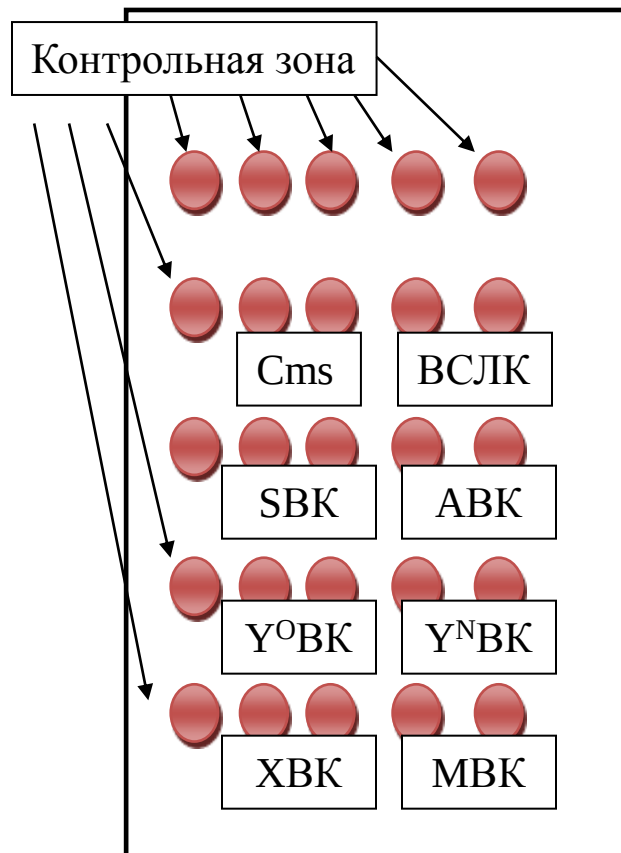


Разработка мультипараметрических тест-систем в точечном формате



**Данный формат анализа позволяет обнаружить
одновременно до четырех патогенов в пробе
в нанограммовых концентрациях**

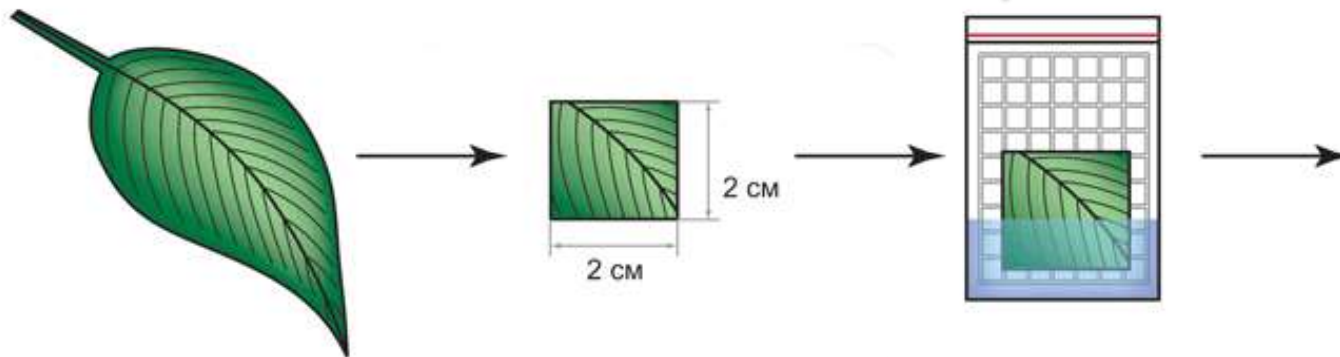
Разработка мультипараметрических тест-систем в точечном формате для детекции восьми патогенов



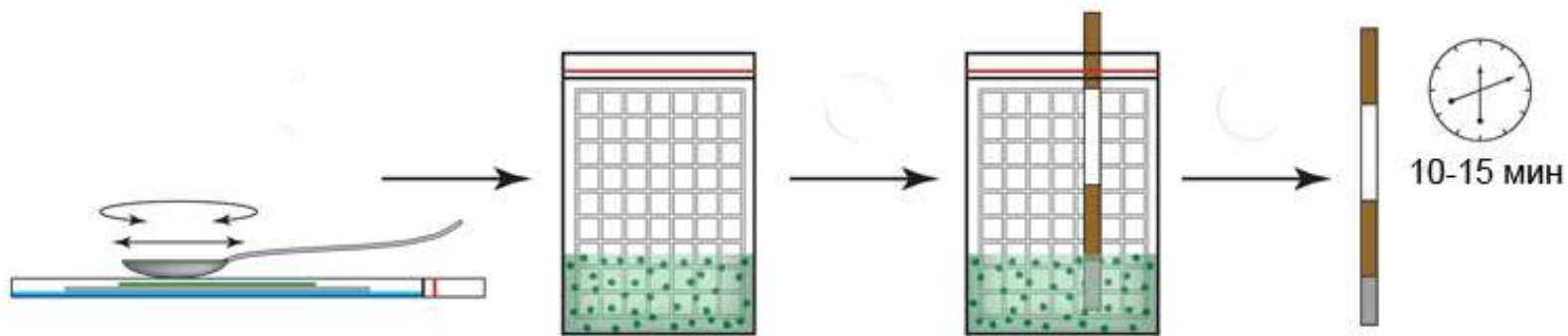
**Данный формат анализа позволяет обнаружить одновременно
до восьми патогенов в пробе
в нанограммовых концентрациях**

Приготовление экстракта и проведение анализа

5 шагов = 10-15 минут



Подготовка пробы

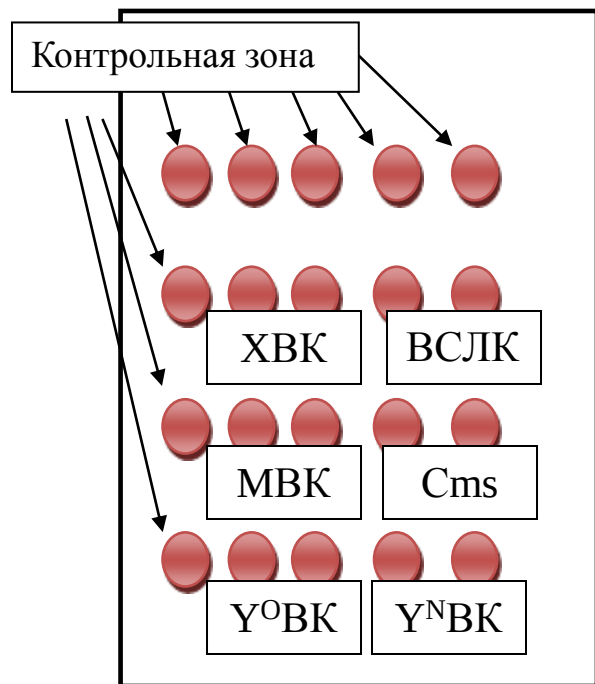


Анализ

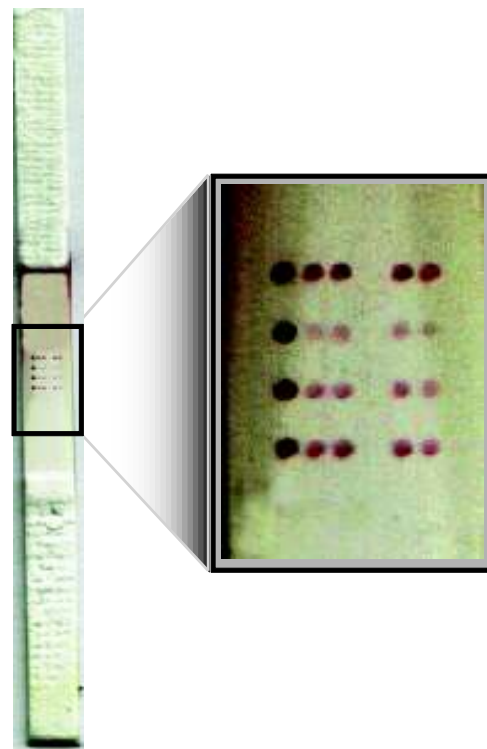
Регистрация
результата

Одновременная детекция шести фитопатогенов в растительном экстракте

Фитопатогены: ХВК, ВСЛК,
МБК, Cms, Y^оВК, Y^нВК



Время анализа – **15 мин**



Области применения

- ❖ Полевой мониторинг пораженности растений
- ❖ Контроль семенного и посадочного материала
- ❖ Карантинный анализ экспортируемого материала



Спасибо за внимание!