

В.К.Швидченко, кандидат сельскохозяйственных наук

В.Т.Хасанов, кандидат биологических наук

М.А.Фида

Б.Бейсембина

Казахский агротехнический университет имени С.Сейфуллина

П.Н.Харченко, академик

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Я.И.Алексеев

К.А.Благодатских, кандидат биологических наук

А.С.Казанцев

Н.Ю.Минакова

Закрытое акционерное общество "Синтол"

E-mail: jalex@iab.ac.ru

УДК 635.24:632.937.16:576.8.077

Сравнение методов иммуноферментного анализа и ПЦР в реальном времени для диагностики зараженности сортообразцов картофеля вирусами*

В статье рассмотрены результаты выявления вирусных заболеваний картофеля методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для отбора пораженных клонов и применения их в исследованиях экспресс-теста ИХА. Анализ сортообразцов показал, что данные, полученные с помощью ПЦР-РВ, обладают большей диагностической ценностью.

Ключевые слова: картофель, вирусные заболевания, ИФА, ПЦР-РВ, сортообразец, РНК, обратная транскрипция

COMPARING THE METHODS OF ENZYME-LINKED ANALYSIS AND PCR IN REAL TIME FOR DIAGNOSTICS OF INFECTION BY VIRUSES IN POTATO VARIETY SAMPLES

**Shvidchenko V.K., Khasanov V.T., Fida M.A., Beisemбина B., Kharchenko P.N., Alekseev Ya.I.,
Blagodatskikh K.A., Kazantsev A.S., Minakova N.Yu.**

The article considers the identification of virus infections in potato by enzyme-linked immune assay and PCR-methods for selecting infected clones and their using in research of IHA express-test. The article confirms the necessity of producing monoclonal antibodies while performing diagnostic tests, aimed to eliminate cross reactions.

Key words: potato, virus infections, enzyme-linked immune assay and PCR-PB, variety sample, RNA, reverse transcription

В биотехнологии оздоровления и размножения растений картофеля для получения высококачественного посадочного материала требуется диагностика вирусных заболеваний с применением наиболее высокочувствительных методов. В настоящее время в практике безвирусного семеноводства картофеля применяют различные классические методы диагностики: цитологические, серологические, растительный-индикаторов и т.д. [3, 4, 6]. Наиболее простые и быстрые – методы иммунодиагностики (капельная агглютинация, преципитация, радиальная иммунодиффузия в агаре и др.). Однако они имеют узкий спектр выявления вирусов и относительно низкую аналитическую чувствительность. Поэтому, наряду с этими методами, используют иммуноферментный анализ и полимеразную цепную реакцию.

ИФА – высокочувствительный метод иммунодиагностики большинства фитопатогенных вирусов, который позволяет обнаружить в образце белковую оболочку вирусов в концентрации 10 нг/мл [2, 4, 10].

Чтобы выявить вирусные и виroidные заболевания сельскохозяйственных растений, особенно на ранних стадиях, применяют метод ПЦР. Он существ-

венно повышает надежность контроля, так как с его помощью ведется анализ непосредственно генома вируса. Метод ПЦР позволяет определить наличие одной молекулы виroidа (например, виroid веретеновидности клубней картофеля – ВВКК) в одной тысяче клеток и более [6]. В последнее время для решения поставленных задач достаточно хорошо зарекомендовал себя метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) [1]. Благодаря появлению дополнительного уровня специфичности, обусловленного наличием в реакционной смеси флуоресцентного зонда, этот метод можно считать эталоном аналитической специфичности при проведении потоковых исследований.

Цель работы – выявить вирусные заболевания картофеля методами ИФА и ПЦР для отбора пораженных клонов и применения их в испытаниях экспресс-теста ИХА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований – 13 сортообразцов картофеля из коллекции Научно-образовательного инновационного центра агробиологических исследований АО "Казахский агротехнический университет имени С.Сейфуллина": Cherie (Ch), Blue Sweden (BS№ 1, BS№ 3), BoraVallei (BV№ 3, BV№ 4, BV№ 6), Ditta (D№ 2, D№ 3, D№ 2,2), CryVallei (CV) Адретта (ATM-11, ATM-2), BlueCongo (BC № 7). Сортообраз-

* Работа проведена в рамках проекта "Разработка экспресс-теста для диагностики вирусных заболеваний картофеля", бюджетная программа 055 МОН РК, с использованием научного оборудования и методик Центра коллективного пользования "ВНИИСБ".

Таблица 1.

Сортообразец	Результаты анализа проб методом ИФА на наличие вирусов, ед. оптической плотности (n=3)					
	PVX	PVY	PVM	PLRV	PVS	PVA
BC № 7	отрицательный	отрицательный	отрицательный	положительный (0,203±0,015)	отрицательный	отрицательный
BV № 3	отрицательный	положительный (2,060±0,023)	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
BV № 4	отрицательный	отрицательный	отрицательный	положительный (0,414±0,033)	отрицательный	положительный (0,472±0,044)
BV № 6	отрицательный	положительный (0,954±0,029)	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
D № 2	отрицательный	положительный (1,015±0,039)	отрицательный	положительный (0,316±0,037)	отрицательный	отрицательный
D № 3	отрицательный	положительный (1,131±0,033)	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
BS № 1	отрицательный	положительный (0,647±0,026)	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
BS № 3	отрицательный	положительный (1,127±0,032)	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
CV	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный	отрицательный
ATY -11	отрицательный	положительный (1,547±0,037)	положительный (0,346±0,038)	отрицательный	положительный (1,072±0,043)	отрицательный
ATM -2	отрицательный	отрицательный	положительный (0,895±0,045)	отрицательный	отрицательный	отрицательный
Ch	положительный (0,252±0,028)	отрицательный	отрицательный	положительный (0,210±0,020)	отрицательный	отрицательный
D № 2.2	положительный (0,261±0,030)	положительный (0,632±0,043)	отрицательный	положительный (0,562±0,045)	отрицательный	положительный (0,313±0,033)
Контроль:						
положительный	1,390±0,034	0,728±0,037	0,791±0,041	0,177±0,016	0,725±0,029	0,183±0,020
отрицательный	0,016±0,017	0,032±0,013	0,003±0,022	0,021±0,009	0,018±0,019	0,009±0,021

Примечание. В скобках приведены средние значения и среднеквадратические отклонения для трех независимых определений (то же в табл.2)

Таблица 2.

Сортообразец	Результаты анализа проб методом ПЦР-РВ на наличие вирусов, пороговый цикл реакции (n=3)					
	PVX	PVY	PVM	PLRV	PVA	PVS
BC № 7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BV № 3	N/A	положительный (18,08±0,2)	положительный (24,82±0,3)	N/A	N/A	N/A
BV № 4	N/A	положительный (18,96±0,3)	положительный (27,98±0,4)	N/A	N/A	N/A
BV № 6	N/A	положительный (26,42±0,2)	положительный (23,85±0,3)	N/A	N/A	N/A
D № 2	N/A	положительный (15,73±0,2)	N/A	N/A	N/A	N/A
D № 3	N/A	положительный (19,59±0,1)	положительный (28,47±0,2)	N/A	N/A	N/A
BS № 1	N/A	положительный (21,51±0,2)	положительный (26,01±0,3)	N/A	N/A	N/A
BS № 3	N/A	положительный (20,27±0,1)	положительный (22,55±0,4)	N/A	N/A	N/A
CV	N/A	положительный (20,98±0,2)	N/A	N/A	N/A	N/A
ATY -11	N/A	положительный (30,48±0,3)	положительный (28,23±0,3)	N/A	N/A	положительный (21,66±0,3)
ATM -2	N/A	N/A	положительный (26,01±0,1)	N/A	N/A	N/A
Ch	N/A	положительный (16,53±0,1)	положительный (26,34±0,2)	N/A	N/A	N/A
D № 2.2	N/A	положительный (17,47±0,1)	N/A	N/A	N/A	N/A

Примечание: N/A нет амплификации, результат отрицательный

цы анализировали на наличие вирусов картофеля: PVX (крапчатая или обыкновенная мозаика), PVY (морщинистая и полосчатая), PVS (крапчатость листьев), PVM (мозаичное закручивание листьев), PVA (складчатая мозаика), PLRV (вирус скручивания листьев картофеля) и PSTVd (ВВКК) методами ИФА (“сэндвич вариант”) и ПЦР-РВ.

Метод двойного наложения антител (“сэндвич-вариант” ИФА). Использовали диагностические наборы для определения вирусов картофеля Всероссийского НИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха (п. Красково-1) [5, 6]. Результаты ИФА учитывали спектрофотометром с вертикальным потоком света (ASYS Expert 96, Австрия) при длине волны 490 нм.

ПЦР-РВ. РНК из образцов выделяли с помощью набора “М-сорб” на магнитных частицах. РНК элюировали в 100 мкл буфера для растворения. Использовали наборы реагентов производства ВНИИСБ и ЗАО “Синтол” для проведения одностадийной реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) на приборе АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно результатам ИФА, большинство сортообразцов в той или иной степени были поражены вирусами PVX, PLRV, PVM, PVS, PVY, PVA как в отдельности, так и их комплексами. Только один из 13 сортообразцов картофеля (CV) был свободен от вирусной инфекции, остальные — преимущественно показали положительную реакцию на вирус PVY (табл. 1).

В таблице 2 приведены значения порогового цикла, полученные методом ПЦР-РВ. Следует считать, что чем меньше цикл, тем больше вирусной РНК в образце.

Большинство сортообразцов картофеля несут комплекс вирусов PVY+PVM. Вирус PVS найден лишь в сортообразце АТМ-11 в комплексе с PVM. Нуклеиновых кислот вирусов PLRV, PVX, PVA (а также вириода PSTVd) в изучаемых пробах не выявлено.

Проведенные исследования показали, что метод ИФА достаточно чувствителен, однако менее специфичен. Из-за перекрестных реакций возможны ложные положительные результаты. Возможности, заложенные в методе ПЦР-РВ, позволяют достичь отсутствия перекрестных реакций и способности выявлять РНК конкретного инфекционного агента в присутствии гетерологичных нуклеиновых кислот, в том числе ДНК организма растения-хозяина [6, 8]. В исследуемых сортообразцах не определены нуклеиновые кислоты вирусов PLRV, PVX, PVA, в то время как, согласно данным ИФА, шесть сортообразцов поражены хотя бы одним.

Принимая во внимание вид анализируемых проб, а также факт, что интерпретация результатов ПЦР-РВ опирается на данные внутренних положительных контролей выделения, обратной транскрипции и собственно амплификации [9], вероятность получения ложного отрицательного ответа при анализе сортообразцов методом ПЦР-РВ близка к нулю. Наборы реагентов для проведения анализа проб методом ОТ-ПЦР-РВ обладают дополнительным контролем — независимой реакцией, специфичной в отношении гена актина картофеля. Это

позволяет предположить, что анализ сортообразцов на наличие НК — эталон диагностической специфичности в скрининговых исследованиях на предмет зараженности вирусами картофеля.

Если результаты ПЦР-РВ считать истинно отрицательными, то по данным таблиц 1 и 2 следует, что из 57 истинно отрицательных определений, 9 оказались ложными положительными согласно данным ИФА, то есть показатель диагностической специфичности последнего составил 86 %. Также при большой чувствительности амплификационных методов, по ПЦР-РВ удалось выявить вирусную РНК в 21 случае (истинно положительные результаты), тогда как методом ИФА установлен вирусный антиген только в 11 случаях из 21. Следовательно, диагностическая чувствительность ИФА относительно ПЦР-РВ составила 68 %.

Таким образом, данные анализа сортообразцов, полученные с помощью ПЦР-РВ, обладают большей диагностической ценностью. Ложные положительные результаты метода ИФА на основе поликлональных антител, определяют необходимость разработки иммунологических тестов на основе моноклональных антител. Специфичность и чувствительность метода ПЦР-РВ, стремящиеся к эталону, позволили отобрать зараженные моновирусами и их комплексами сортообразцы картофеля, которые будут применяться в испытаниях создаваемого экспресс-теста ИХА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев, Я.И. ПЦР диагностика в современной агробιοтехнологии/Я.И.Алексеев//Проблемы агробιοтехнологии.—М.: ФГБНУ “Росинформагротех”, 2012. — С. 200-226.
2. Анисимов, Б.В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля/Б.В.Анисимов: Практическое руководство.—М.: ФГНУ Росинформагротех, 2004. — С. 3-18.
3. Власов, Ю.И. Сельскохозяйственная вирусология/Ю.И.Власов, Э.И.Ларина.—М.: Колос, 1982. — С. 150-164.
4. Диагностика вирусных и бактериальных болезней картофеля в оригинальном семеноводстве: Методические рекомендации/В.И.Куликова и др.—Кемерово: Кузбассвузиздат, 2004. — 24 с.
5. Контроль качества и сертификация семенного картофеля: Практическое руководство.—М.: ФГНУ Росинформагротех, 2003. — С. 157-174.
6. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)/Я.И.Алексеев, Ю.В.Белов, Д.А.Варламов и др.//Научное приборостроение. — 2006. — Т. 16. — № 3. — С. 132-136.
7. Полякова, М.Н. Сравнительный анализ методов лабораторной диагностики вирусов картофеля. ВНИИСХ биотехнологии/М.Н.Полякова, Ю.Ц.Мартirosян, Т.А.Диловарова. — <http://nkras.ru/nt/2010/Polyakova.pdf>.
8. ПЦР в реальном времени/Д.В.Ребриков и др.—М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. — 223 с.
9. Симаков, Е.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации/Е.А.Симаков, А.И.Усков, Ю.А.Варицева.—М.: МСХ РФ, 2000. — 76 с.
10. Созинова, Л.Ф. Вирусная инфекция картофеля и методы диагностики вирусных заболеваний/Л.Ф.Созинова, А.М.Манадилова: Обзорная информация.—Астана: Акмалинский ЦНТИ, 2003. — 37 с.