

IZOTERMICZNA AMPLIFIKACJA KWAŚÓW NUKLEINOWYCH METODĄ LAMP I JEJ ZASTOSOWANIE W DIAGNOSTYCE PATOGENÓW ZIEMNIAKA

ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY THE LAMP METHOD AND ITS APPLICATION IN DIAGNOSTICS OF POTATO PATHOGENS

dr Krzysztof Treder

IHAR-PIB Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii
e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Streszczenie

W ciągu ostatnich dwóch dekad powstało wiele izotermicznych metod amplifikacji kwasów nukleinowych o dużym potencjale do wykorzystania w diagnostyce patogenów wirusowych, bakteryjnych i grzybowych. Wśród tych technik wyróżnia się metoda LAMP z uwagi na czułość, specyficzność oraz szybkość wykonania. Podobnie jak PCR czasu rzeczywistego wersja LAMP czasu rzeczywistego umożliwia ilościową analizę wyników. Prostsze warianty metody nie wymagają kosztownej aparatury i można je wykonać w warunkach polowych, podobnie jak testy paskowe, od których LAMP jest o kilka rzędów wielkości bardziej czuły. W pracy dokonano przeglądu testów LAMP opracowanych do wykrywania patogenów ziemniaka.

Słowa kluczowe: LAMP, patogeny ziemniaka, RT-LAMP

Abstract

Over the past two decades, many methods have been developed for isothermal amplification of nucleic acids with high potential for use in the diagnosis of viral, bacterial and fungal pathogens. Among these techniques, the LAMP method is the most mature due to high sensitivity, specificity, and speed. Like real-time PCR, the real-time LAMP enables quantitative analysis of results. Simpler variants of the method do not require expensive equipment and can be performed in field similarly as lateral flow tests, from which LAMP is a few orders of magnitude more sensitive. The study reviews LAMP tests designed to detect potato pathogens.

Keywords: LAMP, potato pathogens, RT-LAMP

Opracowana na początku lat 80. XX w. metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. PCR – Polymerase Chain Reaction) zrewolucjonizowała nauki biologiczne i przemysł biotechnologiczny włącznie z diagnostyką patogenów zwierząt i roślin. Można za jej pomocą namnażać (amplifikować) specyficzne fragmenty kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). W połączeniu z reakcją odwrotnej transkrypcji kwasu rybonukleinowego (RNA) do DNA (ang. RT – reverse transcription) jako test RT-PCR pozwala na czułą i specyficzną detekcję wirusów, których genomy zbudowane są z RNA (Treder 2015). Czułość RT-PCR znacznie przewyższa czułość metod immunologicznych, nawet o kilka rzędów wielkości.

Szczegółowy opis techniki PCR i jej wariantów można znaleźć w pracy Chołuj i Przewodowskiego (2014).

Pomimo niewątpliwych zalet wadą PCR jest wysoki koszt aparatury, szczególnie dla wariantów umożliwiających śledzenie reakcji w czasie rzeczywistym (real time RT-PCR). Sam RT-PCR jest również droższy od testu PCR z uwagi na koszt izolacji RNA oraz odwrotnej transkryptazy – enzymu „przepisującego” RNA na jednoniciowe cDNA. Również opracowanie, standaryzacja i wdrożenie testu wiąże się z ponoszeniem wysokich kosztów. Dlatego w ciągu ostatniej dekady poszukiwano alternatywnych metod amplifikacji DNA, niewymagających cyklicznych zmian temperatury, a co za tym idzie – kosztow-

nych termocyklerów. Poszukiwania te skutkowały opracowaniem szeregu metod amplifikacji DNA i RNA zachodzących w jednej temperaturze, czyli w warunkach izotermicznych.

Metody izotermiczne nie wymagają stosowania drogiej aparatury do przeprowadzenia reakcji. Ponadto często charakteryzują się dużo większą szybkością i wydajnością amplifikacji niż PCR. Pozwala to na wykonanie testu w ciągu 15-60 minut przy zachowaniu lub nawet przekroczeniu czułości testu PCR. Pośród wielu obecnie istniejących metod najbardziej obiecująca wydaje się izotermiczna amplifikacja kwasów nukleinowych za pośrednictwem pętli (ang.: Loop-mediated isothermal amplification – LAMP) (Notomi i in. 2015).

Zasada działania testu LAMP

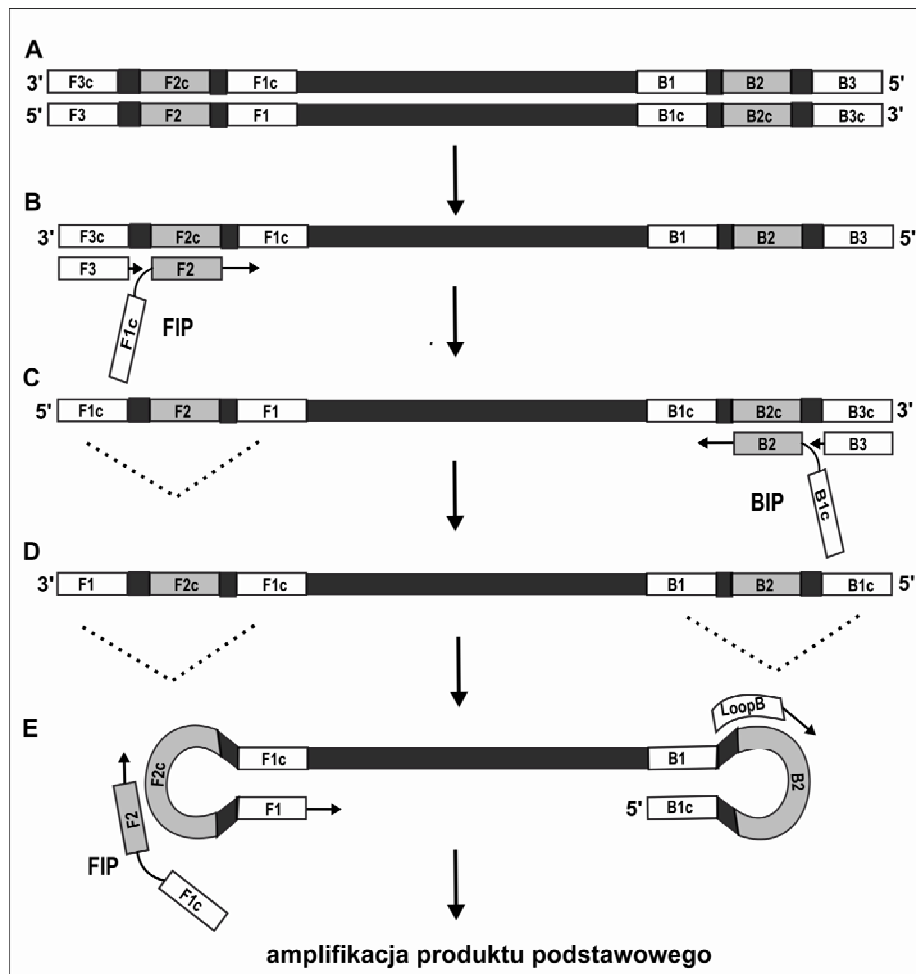
W metodzie stosuje się cztery lub sześć starterów wiążących się specyficznymi (hybrydującymi) do 6-8 regionów DNA (rys. 1). Startery można podzielić na wewnętrzne, zewnętrzne i zapętlające. Do wewnętrznych zaliczamy FIP (ang. Forward Inner Primer) oraz BIP (ang. Backward Inner Primer). Startery wewnętrzne zbudowane są z dwóch segmentów: 5'-końcowego (F1c w FIP, B1c w BIP) oraz 3'-końcowego (F2 w FIP, B2 w BIP). Segment 3'-końcowy hybryduje do komplementarnej sekwencji w matrycowym DNA (F2c, B2c), podczas gdy segment 5'-końcowy jest komplementarny do regionu leżącego bezpośrednio za sekwencją 3'-końcowego segmentu startera w nowo tworzonej nici (F1, B1). Dzięki temu powstający pierwotny produkt reakcji tworzy jednoniciowe pętle na obu końcach (rys. 1B-D).

Startery zewnętrzne F3 (ang. Forward) i B3 (ang. Backward) są komplementarne do regionów DNA okalających fragment amplifikowany przez startery wewnętrzne. Startery te są krótsze, a ich koncentracja w reakcji jest niższa po to, by wolniej od FIP i BIP hybrydowały do matrycy. Ich rola polega na inicjowaniu zastępowania jednej z nici w dwuniciowym (duplesie) DNA przez nić potomną (rys. 1BC). Dzięki temu powstające

w trakcie polimeryzacji nici DNA są uwalniane z duplesu i mogą stanowić matryce dla kolejnych nici potomnych. Omówione pary starterów są w stanie samodzielnie promować amplifikację docelowego regionu DNA w reakcji LAMP przez odpowiednie polimerazy. W celu zwiększenia szybkości i czułości reakcji można dodatkowo stosować komplementarne dla regionów pętli startery zapętlające LoopF i LoopR.

LAMP wykonywany jest w 60-65°C, a startery projektowane są dla regionów DNA, które w tej temperaturze oscylują pomiędzy stanem dwuniciowym i jednoniciowym. Umożliwia to przyłączenie starterów do nici docelowych bez etapu denaturacji termicznej dwuniciowego DNA. Powstawanie nici potomnych katalizuje DNA zależna DNA polimeraza mająca zdolność do wymiany w duplesie DNA nici komplementarnej na nowo syntetyzowaną (ang. strand displacement activity). Obrazowo można powiedzieć, że polimeraza z taką aktywnością, wydłużając nić potomną od miejsca wiązania starterów F3 i B3, rozplata znajdujące się przed nią dwuniciowe DNA, uwalniając tym samym nici, które powstały przez wydłużanie starterów FIP i BIP (rys. 1BC).

Enzym rozpoczyna proces wydłużania przez dołączenie nukleotydu do 3'-końcowej grupy hydroksylowej startera, a następnie dodaje kolejne nukleotydy, wydłużając w ten sposób (polimeryzując) nić potomną. Każdy wprowadzany nukleotyd jest komplementarny do nukleotydu w matrycowej nici DNA. Polimerazy stosowane w LAMP często też są zdolne do przepisywania RNA na cDNA, jednak z mniejszą efektywnością niż klasyczne odwrotne transkryptazy. Metoda LAMP pozwala na szybką i niezwykle wydajną amplifikację DNA. Reakcja w optymalnych warunkach zachodzi w ciągu 5-30 minut. W pierwszej fazie reakcji powstaje produkt podstawowy LAMP zakończony z obu stron pętlami (rys. 1E). Następnie tworzą się coraz dłuższe fragmenty dwuniciowego DNA zbudowane z wzrastającej liczby powtórzeń produktu podstawowego.



Rys. 1. Uproszczony schemat zasady działania reakcji LAMP

(A) Wykrywany fragment DNA z zaznaczonymi miejscami przyłączenia starterów. (B) Przyłączenie starterów FIP oraz F3 do matrycowej nici DNA. Strzałki przy sekwencji starterów oznaczają kierunek, w którym polimeraza wydłuża (polimeryzuje) nić potomną, dołączając kolejne nukleotydy, komplementarne do nukleotydów nici matrycowej. (C) Jednocześnie z nicią DNA inicjowaną przez starter FIP powstaje nić inicjowana przez starter F3. Dzięki zdolności polimeraz stosowanych w LAMP do wymiany nici powoduje to uwolnienie nici FIP z duplexu i umożliwia jej kopiowanie przez starter BIP. (D) Nić potomna inicjowana przez starter BIP ma na końcach sekwencje F1 i B1c, komplementarne do sekwencji wewnątrz nici. (E) Powoduje to powstanie pętli w podstawowym produkcie reakcji LAMP. Przyłączenie starterów FIP i LoopB oraz wydłużanie odcinka F1, który działa jak dodatkowy starter, rozpoczyna ekspotencjalny etap amplifikacji. Analogiczny proces amplifikacji jak opisany wyżej dla nici DNA 3'-5' (A) zachodzi równocześnie dla nici komplementarnej 5'-3'. Animację i szczegółowy schemat mechanizmu reakcji można znaleźć na stronie <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html>

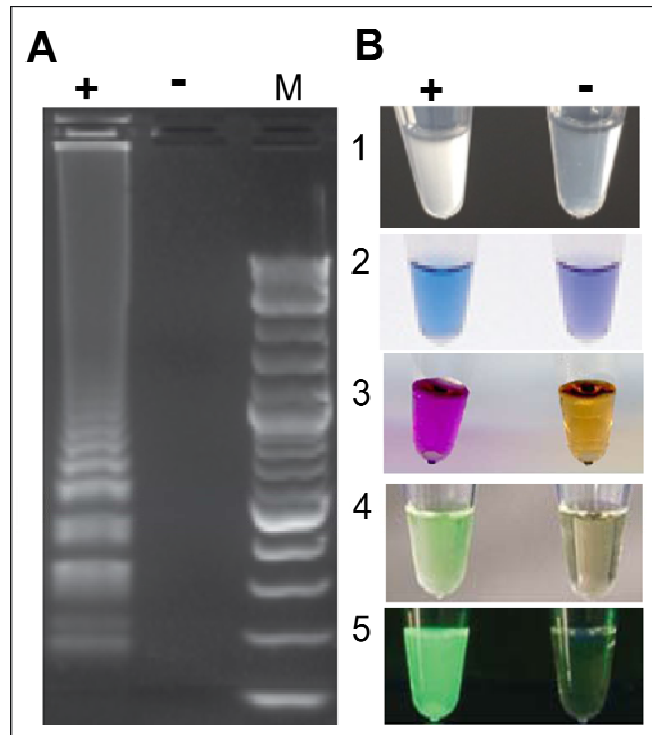
Sposoby wykrywania pozytywnego wyniku reakcji LAMP

Podobnie jak w przypadku PCR produkt amplifikacji LAMP można wykrywać za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym i barwienia żelu po elektroforezie za pomocą roztworu z barwnikiem, który silnie fluoryzuje po związaniu z DNA. Z uwagi na mechanizm LAMP w wybarwionym żelu widoczna jest drabinka prążków utworzonych przez różniące się wielkością powtórzenia produktu podstawowego

(rys. 2A). Wykrywanie produktów LAMP za pomocą elektroforezy należy prowadzić w miejscu odległym od laboratorium, w którym wykonuje się reakcje LAMP. Duża ilość DNA tworzonego w reakcji łatwo zanieczyszcza laboratorium. W efekcie namnożone DNA jest obecne w powietrzu i trafia do badanych prób, próbek i odczynników, co prowadzi do wyników fałszywie pozytywnych w kolejnych testach. Dlatego zalecane są metody wykrywania, w których nie trzeba

otwierać probówek reakcyjnych. Koncentracja DNA produkowanego podczas reakcji LAMP jest tak duża, że pochodzący z wbudowywanych do potomnej nici nukleotydów pirofosforan wraz z magnezem tworzy nierozpuszczalną sól (rys. 2B1). Jest ona widoczna gołym okiem jako zmętnienie w próbach pozytywnych (Mori i in. 2001). Spadek stężenia magnezu w roztworze koreluje ze wzrostem koncentracji produktu amplifikacji w czasie reakcji. Wykorzystano to do opra-

cowania fluorescencyjnego testu LAMP, w którym do reakcji dodaje się fluorescencyjny barwnik – kalceinę oraz jony manganu, które wygaszają fluorescencję kalceiny. Mangan, podobnie jak magnez, tworzy w trakcie reakcji nierozpuszczalną sól z pirofosforanem. Dzięki temu w czasie reakcji następuje wzrost fluorescencji kalceiny (Tomita i in. 2009), który można monitorować w czasie rzeczywistym.



Rys. 2. Wizualne metody wykrywania pozytywnego wyniku reakcji LAMP

Wynik pozytywny oznaczono przez (+), wynik dla reakcji negatywnej znakiem (-). Markery wielkości DNA - M. (A) Rozdział produktów LAMP na żelu agarozowym. (B) Bezpośrednie metody wykrywania. Zmętnienie i osad powstające pod wpływem formowania się w trakcie reakcji pirofosforanu magnezu (B1). Zmiana barwy barwnika HNB z fioletowoniebieskiej na jasnoniebieską pod wpływem spadku stężenia magnezu w roztworze (B2). Zmiana koloru czerwieni neutralnej pod wpływem obniżenia pH roztworu na skutek amplifikacji DNA (B3). Zmiana koloru kalceiny w świetle widzialnym (B4) oraz ultrafioletowym (B5) pod wpływem obniżenia koncentracji magnezu w roztworze reakcyjnym. Źródło zdjęć wykorzystanych do skomponowania ilustracji: <https://www.neb.com/products/e1700-warmstart-lamp-kit-dna-rna#Product%20Information>.

Mniej kosztowny wariant polega na wizualnej obserwacji zielonej fluorescencji prób pozytywnych, podświetlonych światłem niebieskim po zakończeniu reakcji (rys. 2B5). W świetle widzialnym próby pozytywne są również zielone, ale różnica w kolorze prób negatywnych i pozytywnych nie jest już tak wyraźna (rys. 2B4). Inny popularny sposób detekcji polega na dodaniu do prób błękitu

hydroksynaftolowego (HNB), który wraz ze spadkiem stężenia jonów magnezu zmienia kolor z fioletowego lub ciemnoniebieskiego na jasnoniebieski (rys. 2B2) (Goto i in. 2009). Do wizualnego wykrywania produktów LAMP stosowano również zieleń malačitową (Lucchi i in. 2016), fiolet krystaliczny (Miyamoto i in. 2015) czy barwniki będące wskaźnikami pH (Tanner i in. 2015).

Ta szeroka paleta metod umożliwiających wizualną detekcję produktów amplifikacji sprawia, że LAMP nadaje się do opracowania szybkich testów polowych, w których patogeny można wykrywać bezpośrednio w terenie. Dla dodatkowego zwiększenia czułości oraz by umożliwić analizę ilościową, opracowano wiele wariantów LAMP, w których wykorzystuje się urządzenia pozwalające na pomiar zmętnienia, zmiany koloru lub fluorescencji zarówno po zakończeniu reakcji, jak i w czasie rzeczywistym. Analiza ilościowa pozwala nie tylko na stwierdzenie obecności docelowej sekwencji DNA czy RNA, lecz także na oznaczenie ich koncentracji w badanej próbce.

Obecnie dominują fluorescencyjne warianty LAMP, w których wykorzystuje się zarówno kalceinę, jak i barwniki fluorescencyjne stosowane w reakcji PCR czasu rzeczywistego (SybrGreen, EvaGreen czy fluorofory z rodziny Syto), a detekcja zachodzi w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem termocyklera z detektorem fluorescencji (Oscorbin i in. 2016). Z uwagi na całkowicie inną niż w PCR zasadę amplifikacji DNA nie można w reakcji LAMP stosować sond fluorescencyjnych opracowanych dla PCR czasu rzeczywistego. Dlatego w ostatnich latach opracowano sondy fluorescencyjne do LAMP działające poprzez wbudowanie znakowanego fluorescencyjnie oligonukleotydu bezpośrednio w produkt LAMP. Zastosowanie takich sond pozwala na wykrywanie produktu LAMP w czasie rzeczywistym i w sposób ilościowy (Kubota i in. 2011, Tanner i in. 2012, Gadkar i in. 2018).

Przydatność LAMP w diagnostyce

Dużą zaletą omówionej metody jest to, że jest ona całkowicie skomercjalizowana i dostępne są zestawy dostosowane do różnych sposobów wykrywania produktu. Na rynku krajowym szeroki zakres gotowych zestawów do LAMP oferują firmy Nowazym Polska, Lab-JOT, A&A Biotechnology oraz Symbios. W praktyce eliminuje to konieczność optymalizacji warunków reakcji i skraca czas, a także obniża nakład pracy potrzebny do opracowania testu diagnostycznego. Dostępność darmowych i komercyjnych programów do projektowania starterów do LAMP również ułatwia opracowanie specy-

ficznej dla docelowego patogenu procedury. Ponadto Nowazym Polska oraz A&A Biotechnology oferują usługę projektowania starterów do wykrywania konkretnego organizmu lub genu oraz optymalizacji warunków testu.

Plastyczność metody pozwala na to, by opracować zarówno warianty jakościowe, możliwe do wykonania przy niskim nakładzie kosztów, jak i wersje ilościowe, wykorzystujące zaplecze sprzętowe stosowane dotąd w technice PCR czasu rzeczywistego. Na rynku obok termocyklerów pojawiają się mniej kosztowne i dostosowane do przeprowadzenia reakcji w warunkach polowych urządzenia, które są połączeniem bloku termicznego z detektorem fluorescencji, jak np. aparat Genie firmy OptiGen czy BioRanger firmy Diagenetix. Ponadto polimerazy stosowane w teście LAMP wykazują znacznie większą odporność na substancje hamujące aktywność polimeraz stosowanych w reakcji PCR (Kaneko i in. 2007). Pozwala to na znaczne uproszczenie przygotowania prób przed wykonaniem detekcji.

Z uwagi na ww. zalety LAMP wydaje się idealnym następcą PCR i PCR czasu rzeczywistego w szeroko rozumianej diagnostyce. W ciągu ostatnich dwóch lat powstało ponad 5000 publikacji opisujących procedury LAMP i RT-LAMP do wykrywania bakteryjnych, grzybowych i wirusowych patogenów zwierząt i roślin (wg Google Scholar). Dzięki temu, że trzy pary starterów stosowanych w LAMP rozpoznają osiem różnych regionów w wykrywanym DNA, metoda jest wysoce specyficzna. Oznacza to, że jeżeli startery zostaną dobrze dobrane, ryzyko wyników fałszywie pozytywnych jest mniejsze niż w innych metodach. Specyficzność LAMP pozwala również na wykrywanie jednoklebowych różnic (SNP), a zastosowanie sond fluorescencyjnych umożliwia jednoczesną detekcję kilku patogenów lub szczepów danego patogenu czy wariantów genu.

Zastosowanie LAMP do wykrywania patogenów ziemniaka

Technika LAMP jest coraz szerzej wykorzystywana w diagnostyce patogenów ziemniaka. Hansen i inni (2016) opracowali dla *Phytophthora infestans*, sprawcy zarazy ziemniaka, wizualny test LAMP oparty na barwni-

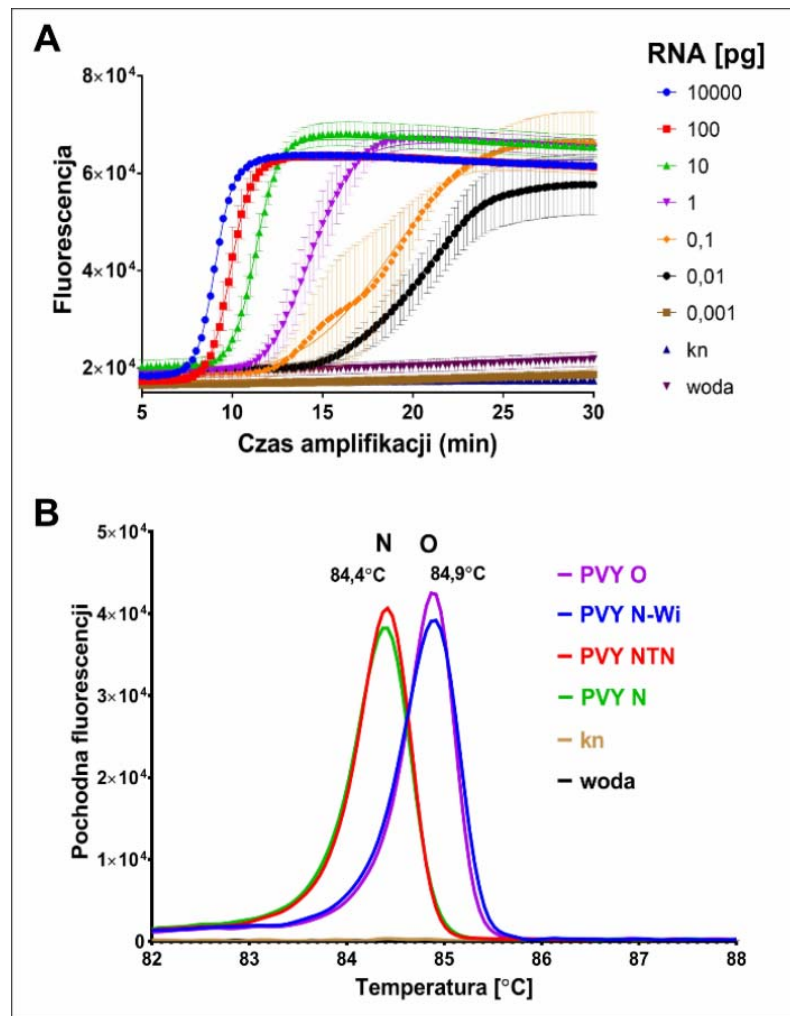
ku HNB. Test umożliwił wykrywanie *P. infestans* w zainfekowanych roślinach, glebie oraz w wodzie, lecz wymagał stosunkowo dużej koncentracji patogenu w badanych próbach. Khan i inni (2017), wykorzystując kalceinę, opracowali wizualny wariant LAMP, którego czułość była stokrotnie wyższa od czułości testu PCR w czasie rzeczywistym. Test umożliwił wykrycie *P. infestans* nawet 60 minut po sztucznym zainfekowaniu roślin.

Podobną czułość miał test LAMP czasu rzeczywistego opracowany przez Si Ammour i innych (2017). Dzięki zastosowaniu fluorescencyjnej sondy ten wariant testu umożliwił również ilościową analizę produktów amplifikacji. Ponadto autorzy znacząco uproszcili przygotowanie prób do testu, zastępując kilkietapową izolację DNA krótkim gotowaniem fragmentu tkanki ziemniaka w małej objętości buforu ekstrakcyjnego (Si Ammour i in. 2017). W podobnie przygotowanych próbach możliwe było wykrywanie kwarantannowej bakterii *Ralstonia solanacearum* za pomocą fluorescencyjnego testu egl LAMP czasu rzeczywistego (Lenarčič i in. 2014).

Gotowanie prób okazało się również skuteczne w wykrywaniu sprawców czarnej nózki i mokrej zgnilizny ziemniaka za pomocą LAMP czasu rzeczywistego: *Pectobacterium carotovorum* (Yasuhara-Bell i in. 2016), *Dickeya* sp. (Yasuhara-Bell i in. 2017) oraz *Pectobacterium atrosepticum* (Hu i in. 2016). W testach na *P. carotovorum* i *Dickeya* sp. poza specyficznymi dla badanych patogenów starterami wykorzystano również fluorescencyjnie znakowane sondy, co dodatkowo umożliwiło ilościową analizę wyników (Yasuhara-Bell i in. 2016, 2017). Test na *P. atrosepticum* również umożliwił ilościową analizę wyników, lecz oparty był na pomiarze w czasie rzeczywistym fluorescencji barwnika SybrGreen (Hu i in. 2016).

Szczególne wyzwanie w diagnostyce ziemniaka stanowią wiroid wrzecionowatości ziemniaka (PSTVd) i wirusy infekujące ziemniaki. Ich genomy zbudowane są z RNA, który jest znacznie mniej stabilny od DNA i łatwo ulega samoczynnej degradacji. Ponadto z uwagi na powszechną obecność rybonukleaz w próbach biologicznych RNA jest dodatkowo narażony na szybkie trawienie przez te enzymy. Trudnym materiałem do wykrywania specyficznego RNA patogenów są tkanki i organy ziemniaka, rośliny bogate nie tylko w rybonukleazy, ale również w polifenole, skrobię i enzymy katalizujące szereg reakcji redox. Metody skutecznego wykrywania RNA w takim materiale mają duży potencjał aplikacyjny do wykrywania wirusów w innych materiałach biologicznych. Z uwagi na mniejszą niż PCR wrażliwość na inhibitory amplifikacji test LAMP wydaje się szczególnie przydatny do wykrywania RNA w tkankach ziemniaka.

Jak wspomniano wyżej, polimerazy stosowane w LAMP mają zdolność do odwrotnej transkrypcji, więc wykrywanie RNA nie wymaga dodania odwrotnej transkryptazy, jednak obecność tego enzymu w reakcji skraca czas i czułość detekcji. Tego typu test RT-LAMP opracowano dla PSTVd (Lenarčič i in. 2012), wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV) (Almasi i in. 2012) oraz wirusa Y ziemniaka (PVY) (Nie 2005, Almasi i in. 2013, Hasiów-Jaroszewska i in. 2015, Przewodowska i in. 2015, Treder i in. 2018). Test opracowany dla PSTVd miał 10-krotnie większą czułość detekcji w porównaniu z testem RT-PCR i pozwalał na wykrycie PSTVd zarówno w liściach, jak i w bulwach. Czas wykonania testu wynosił od 15 do 25 minut zależnie od koncentracji wiroida w próbach (Lenarčič i in. 2012).



Rys. 3. Wykrywanie wirusa Y ziemniaka (PVY)

za pomocą fluorescencyjnego testu RT-LAMP w czasie rzeczywistym wg Tredera i innych (2018)

(A) Krzywe amplifikacji uzyskane dla próbek zawierających malejącą koncentrację RNA. RNA z rośliny wolnej od wirusa oznaczono jako kn. Reakcję, do której dodano wodę zamiast RNA, oznaczono jako „woda”. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe z trzech niezależnych powtórzeń. (B) Różnicowanie genotypów białka płaszcza O i N odpowiadających serotypom PVY za pomocą analizy temperatury topnienia produktu RT-LAMP po zakończeniu reakcji (B)

Almasi i inni (2012) opracowali immunosorbcyjny wariant testu (ang. ImmunoCapture = IC-RT-LAMP), w którym cząstki PLRV były wiązane na powierzchni probówek pokrytych przeciwciałami specyficznymi wobec wirusa i po odpłukaniu soku w tych samych probówkach wykonywano reakcję LAMP. Autorzy wykazali, że pozytywny wynik reakcji można było monitorować zarówno za pomocą zmętnienia próbek, jak i poprzez zmianę koloru różnych barwników (Almasi i in. 2012). Oparty na zmętnieniu próbek wariant RT-LAMP opracowano również dla PVY (Nie 2005). Hasiów-Jaroszewska i inni (2015) opracowali wizualny test RT-LAMP, w którym produkt reakcji wykrywano poprzez do-

danie barwnika SybrGreen do próbek po zakończeniu amplifikacji. Test można było wykonać w łaźni wodnej lub bloku termicznym i umożliwiał on detekcję różnych szczepów PVY z czułością wyższą od RT-PCR (Hasiów-Jaroszewska i in. 2015).

Prace nad wykrywaniem wirusów ziemniaka prowadzone są także w Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Biochemii (IHAR-PIB, Oddział w Boninie). W trakcie tych prac opracowano fluorescencyjny test RT-LAMP czasu rzeczywistego pozwalający na ilościową detekcję PVY w ciągu 8-30 minut z czułością 10-krotnie wyższą od RT-PCR i 1000-krotnie wyższą od DAS-ELISA i testów paskowych (Przewodowska i in. 2015). Efek-

tem kontynuacji badań było opracowanie starterów, które pozwoliły zwiększyć czułość RT-LAMP czasu rzeczywistego i umożliwiły różnicowanie izolatów PVY pod względem genotypów białka płaszczka kodujących białko o serotypie N lub O (rys. 3) (Treder i in. 2018). Ponadto opracowano metodę szybkiej izolacji RNA z tkanek ziemniaka za pomocą nanocząstek magnetycznych, możliwą do wykonania w warunkach polowych (Treder i in. 2018). W Pracowni prowadzone są dalsze prace nad wykrywaniem wirusów ziemniaka za pomocą RT-LAMP. Celem jest m.in. opracowanie testu RT-LAMP, który można będzie wykonać z pominięciem izolacji RNA bezpośrednio na ekstraktach z tkanek ziemniaka, oraz opracowanie multipleksowej wersji testu, dzięki której możliwe będzie wykrywanie kilku wirusów z jednej próby.

Literatura

- Almasi M. A., Moradi A., Nasiri J., Karami S., Nasiri M. 2012.** Assessment of performance ability of three diagnostic methods for detection of potato leafroll virus (PLRV) using different visualizing systems. – *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168: 770-784;
- Chołuj J., Przewodowski W. 2014.** Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemniaka. – *Ziemn. Pol.* 3: 40-45;
- Gadkar V. J., Goldfarb D. M., Gantt S., Tilley P. A. G. 2018.** Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes. – *Sci. Rep.* 3, 8(1): 5548, doi: 10.1038/s41598-018-23930-1;
- Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. 2009.** Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. – *Biotechniques* 46: 167-172;
- Hansen Z. R., Knaus B. J., Tabima J. F., Press C. M., Judelson H. S., Grunwald N. J., Smart C. D. 2016.** Loop-mediated isothermal amplification for detection of the tomato and potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. – *J. Appl. Microbiol.* 120: 1010-1020;
- Hasiów-Jaroszewska B., Stachecka J., Minicka J., Sowiński M., Borodynko N. 2015.** Variability of Potato virus Y in tomato crops in Poland and development of a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification method for virus detection. – *Phytopathology* 105: 1270-1276;
- Hu L. X., Yang Z. H., Zhang D., Zhao D. M., Zhu J. H. 2016.** Sensitive and rapid detection of *Pectobacterium atrosepticum* by targeting the gyrB gene using a real-time loop-mediated isothermal amplification assay. – *Lett. Appl. Microbiol.* 63: 289-296;
- Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T. 2007.** Tolerance of loop-mediated-isothermal amplification to a culture medium and biological substances. – *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 499-501;
- Khan M., Li B., Jiang Y., Weng Q., Chen Q. 2017.** Evaluation of different PCR-Based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the Ypt1 gene. – *Front Microbiol.* 2017 Oct 5, 8:1920. doi: 10.3389/fmicb.2017.01920;
- Kubota R., Alvarez A. M., Su W., Jenkins D. M. 2011.** FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). – *Biol. Eng. Trans.* 4: 81-100;
- Lenarčič R., Morisset D., Mehle N., Ravnikar M. 2012.** Fast real-time detection of potato spindle tuber viroid by RT-LAMP. – *Plant Pathol.* 62: 1147-1156;
- Lenarčič R., Morisset D., Pirc M., Llop P., Ravnikar M., Dreo T. 2014.** Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* 9(4): e96027. doi:10.1371/journal.pone.0096027;
- Lucchi N. W., Ljolie D., Silva-Flannery L., Udhayakumar V. 2016.** Use of malachite green-loop mediated isothermal amplification for detection of *Plasmodium* spp. parasites. – *PLoS One.* 2016 Mar 11,11(3): e0151437;
- Miyamoto S., Sano S., Takahashi K., Jikihara T. 2015.** Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes. – *Anal. Biochem.* 473: 28-33;
- Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. 2001.** Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 150-154;
- Nie X. 2005.** Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of Potato Virus Y. – *Plant Dis.* 89: 605-610;
- Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. 2015.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. – *J. Microbiol.* 53: 1-5;
- Oscorbin I. P., Belousova E. A., Zakabunin A. I., Boyarskikh U. A., Filipenko M. L. 2016.** Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). – *Biotechniques* 61: 20-25;
- Przewodowska A., Zacharzewska B., Chołuj J., Treder K. 2015.** A one-step, real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay to detect Potato virus Y. – *Am. J. Potato Res.* 92: 303-311;
- Si Ammour M., Bilodeau G. J., Tremblay D. M., Van der Heyden H., Yaseen T., Varvaro L., Carisse O. 2017.**

- Development of Real-Time Isothermal Amplification Assays for On-Site Detection of *Phytophthora infestans* in Potato Leaves. – Plant Dis. 101: 1269-1277; **21. Tanner N. A., Zhang Y., Evans T. C. 2012.** Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. – Biotechniques 53: 81-89; **22. Tanner N. A., Zhang Y., Evans T. C. 2015.** Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. – Biotechniques 58: 59-68; **23. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. 2008.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. – Nat. Protoc. 3: 877-882; **24. Treder K. 2015.** Metody wykrywania obecności wirusów. – Ziemi. Pol. 4: 18-23; **25. Treder K., Choluż J., Zacharzewska B., Babujee L., Mielczarek M., Burzyński A., Rakotondrafara A. M. 2018.** Optimization of the magnetic capture RT-LAMP assay for fast and real-time detection of Potato virus Y and differentiation N and O serotypes. – Arch. Virol. 163: 447-458; **26. Yasuhara-Bell J., Marrero G., De Silva A., Alvarez A. M. 2016.** Specific detection of *Pectobacterium carotovorum* by loop-mediated isothermal amplification. – Mol. Plant Pathol. 9: 1499-1505; **27. Yasuhara-Bell J., Marrero G., Arif M., de Silva A., Alvarez A. M. 2017.** Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of *Dickeya* spp. – Phytopathology 107: 1339-1345