

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 577.175.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ Y-ВИРУСОМ И ВИРУСОМ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ

О.А. Кондакова¹, К.О. Бутенко¹, Е.В. Скурат¹, Ю.Ф. Дрыгин^{2,*}

¹ Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского; Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

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

Для молекулярной диагностики инфекций картофеля Y-вирусом и вирусом скручивания листьев картофеля (ВСЛК) разработаны иммунохроматографические тест-системы. Чтобы размножить антиген — капсидный белок труднодоступного флоромно-ограниченного ВСЛК, был создан бинарный вектор, содержащий кДНК рекомбинантной РНК тобамовируса, в которой ген капсидного белка был заменен на ген белка оболочки ВСЛК. Рекомбинантная тобамовирусная РНК упаковывалась белком оболочки ВСЛК в сферические вирусные частицы. Химерный вирус был инфекционен, а выход его и белка оболочки ВСЛК при выделении был в 800 раз выше, чем у дикого типа. К химерному вирусу были получены антитела для лабораторного и полевого анализа инфекции картофеля. На основании опыта разработки и применения диагностических тест-систем предлагается тактика рациональной массовой лабораторной и практической диагностики вирусных заболеваний организмов на молекулярном уровне.

Ключевые слова: Y-вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля, химерный вирус, иммунохроматография, инфекция, молекулярная диагностика.

Молекулярная диагностика инфекций является частным случаем поиска целевой нуклеотидной последовательности и/или целевого антигена. В общем случае молекулярная диагностика не зависит от биологической природы патогена и организма хозяина, меняется только метод подготовки образца к анализу [1].

Современная массовая диагностика основана на двух принципах молекулярного взаимодействия: на молекулярной гибридизации комплементарных гетероциклических оснований нуклеиновых кислот и на узнавании антигена антителом. В недалеком будущем геномное секвенирование и генетические паспорта организмов станут обычными. В этом случае молекулярная диагностика сможет не только устанавливать окончательный диагноз, но и, возможно, позволит узнать, как возникло заболевание.

В лабораторной диагностике фитопатогенов наиболее часто используются иммуноферментные и иммунохимические анализы (ИФА, ИХА), иммунохроматографические тест-системы (ИХТС), иммуночипы; ДНК(РНК)-зонды, ПЦР и ОТ-ПЦР (обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция), ДНК(олигонуклеотиды)-чипы. Для достижения предельной чувствительности диагностического анализа, например, в технологии ОТ-ПЦР—МГА (молекулярный-гибридизационный анализ)—ИФА, системы усиления сигнала комбинируют [2].

Доминирующими в практической лабораторной диагностике вирусов растений являются технологии

иммуноферментного анализа, молекулярного гибридизационного анализа и различные варианты полимеразной цепной реакции ввиду их высокой чувствительности, специфичности и производительности. Для одновременного выявления нескольких патогенов в одном образце предлагаются различные технические решения, из которых наиболее перспективным представляется развитие чиповой технологии.

В МГУ на кафедре вирусологии биологического факультета и в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского совместно с ВНИИКХ имени А.Г. Лорха разработано несколько высокоэффективных методов молекулярной диагностики вирусных и виroidной инфекций картофеля для анализа Центральной коллекции оздоровленных сортообразцов картофеля на базе ВНИИКХ имени А.Г. Лорха. В частности, была разработана высокочувствительная (1 пг РНК фитопатогена) технология визуальной молекулярной диагностики виroidной и вирусных инфекций картофеля методом молекулярной гибридизации ДНК-зондов, меченных диен-платиной (МГА—ИФА технология) [3]. Комбинированная технология ОТ-ПЦР и МГА—ИФА (определение продукта амплификации проводилось специфическим ДНК-зондом, который, в свою очередь, определялся иммуноферментным анализом с хемилюминисцентным субстратом) позволила достичь предельной чувствительности визуальной молекулярной диагностики виroidной и вирусных ин-

фекций картофеля — одну молекулу РНК вириода или вируса в анализируемой пробе [2]. ДНК-чип низкой плотности, разработанный нами, способен одновременно определять шесть вирусов и вириод картофеля на нитратцеллюлозной мембране [4]. В этой технологии суммарную РНК из зараженных и незараженных растений, гибрид которой с рекомбинантной ДНК определяли с помощью иммуноферментного анализа, метили гаптенем—диен-платиной. Полученные макрочипы можно было использовать повторно.

В Российской Федерации наибольший экономический ущерб картофелеводству наносят вирусы Y, M, S, X, ВСЛК (PLRV — Potato leafroll virus) и вириод скручивания листьев картофеля (PSTVd — Potato spindle tuber viroid). ВСЛК относится к роду *Polerovirus* семейства *Luteoviridae* и является флоэмно-ограниченным, труднодоступным и высоко патогенным вирусом картофеля. По литературным данным урожайность инфицированных им растений снижается на 38–70%. Растения отстают в росте, листья становятся хлоротичными, края долек листа скручиваются вдоль средней жилки. Листья больных растений хрупкие, кожистые. Клубни мелкие, часто вытянутой или веретеновидной формы, флоэмная ткань как клубней, так и стеблей и листьев некротизируется. В природе вирус переносится тлями. Установлено, что ВСЛК может присутствовать в растениях в латентном состоянии, что делает актуальным диагностику его скрытой зараженности. По вредоносности ВСЛК идет вслед за вирусом Y и наносит серьезный ущерб урожаю картофеля, а в смешанных инфекциях может уничтожить вплоть до 90% урожая. В силу высокой токсичности в природе ВСЛК накапливается в очень небольших количествах, из килограмма зараженных листьев дурмана или физалиса удается выделить 1,3 мг вирусных частиц [5].

В настоящее время единственной технологией, удовлетворяющей требованиям современной массовой диагностики на практике, является иммунохроматография на тест-полосках. Быстро развивающаяся современная аналитическая технология иммунохроматографического определения широкого спектра биологически активных соединений различной природы вытесняет в силу своей простоты и скорости анализа традиционные твердофазные методы ИФА. В литературе такой подход получил обобщенное название “проточный латеральный иммуноанализ”. Дешевые, быстрые и простые аналитические технологии на основе иммунохроматографии позволяют проводить высокочувствительные измерения без специальных навыков и оборудования даже в полевых условиях. Являясь эффективным средством диагностирования, иммунохроматографические экспресс-тесты позволяют в течение нескольких минут определить и оценить содержание различных диагностически важных биологически активных веществ [6–10].

Поскольку молекулярная диагностика фитопатогенов сельскохозяйственных растений на практике позволяет сэкономить значительные средства, разрабатываемые методы диагностики защищаются патентами, а компании-разработчики производят для продажи диагностические наборы, компоненты которых закодированы и защищены авторским правом. В силу вышеперечисленных причин, массовая молекулярная диагностика фитопатогенов этих растений в России находится в заметно отстающем состоянии.

Ранее нами было описано применение иммунохроматографического анализа для определения ВТМ [11] и обнаружения вируса X картофеля [12].

Цель настоящей работы — представить результаты разработки и испытаний прототипов иммунохроматографических тест-систем (ИХТС) для массовой диагностики инфекций картофеля вирусом Y и ВСЛК.

Материалы и методы

Вирус Y картофеля и антисыворотка к нему были получены из ВНИИКХ имени А.Г. Лорха.

Для размножения флоэмно-ограниченного ВСЛК, переносимого в природе тлями, нами был создан бинарный вектор. Растения *N. benthamiana* заражались этим вектором с помощью агроинфильтрации и через неделю изометрические вирионы, состоящие из РНК тобамовируса и белка оболочки ВСЛК, выделяли из листьев трех верхних ярусов. Зараженные листья гомогенизировали в блендере в 0,1 М цитратном буфере, доведенном 0,5 М Na_2HPO_4 до pH 6,5, в присутствии 0,1%-ного β -меркаптоэтанола и 1%-ного Тритон X-100. Гомогенат инкубировали 30 мин при перемешивании (0°C), отделяли осадок дебриса при 10 тыс. об/мин на центрифуге Beckman J-21C в роторе JA-20 в течение 10 мин, дополнительно супернатант осветляли 0,25 объемами хлороформа. Далее вирус выделяли ультрацентрифугированием при 100 000g в течение 2 ч через 20%-ную сахарозную подушку.

Иммунизацию кроликов проводили 5–7 раз суспензией химерного вируса (150–200 мкг) в фосфатно-солевом буфере (pH 7–7,2) подкожно с интервалом 10–14 сут. Первые две иммунизации проводили с полным и неполным адьювантом Фрейнда. Глобулиновую фракцию белков из кроличьей антисыворотки выделяли осаждением сульфатом аммония. Фракцию поликлональных первичных антител получали на сорбенте DEAE-Toyo-Pearl (Toyo-Soda, Япония) элюцией 50 мМ NaCl.

Концентрацию антител определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{280} = 2,08 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [13]. Оценку чистоты антител проводили электрофорезом в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Препарат коллоидного золота получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты

цитратом натрия [11]. Определение среднего размера частиц коллоидного золота проводили на просвечивающем электронном микроскопе Jeol 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кэВ. Для электронной микроскопии использовали углеродные пленки-подложки.

В работе использовали коммерческие (“Имтек”, Россия) антивидовые (вторичные) антитела — козы иммуноглобулины (IgG) против иммуноглобулинов кролика. Иммунизацию антител к вирусам на поверхности частиц коллоидного золота проводили по методике, описанной нами ранее [11].

Экстракты из здоровых и зараженных вирусами растений получали путем растирания 100 мг листового материала или проростков в фарфоровой ступке с добавлением 1,0 мл ТФБ (10 мМ Трис, 10 мМ фосфат натрия, pH 7–7,5). Полученный гомогенат (1:10; растительная масса/объем буфера) центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин. Осветленный экстракт анализировали с помощью твердофазного метода “сэндвич”-ИФА. При иммунохроматографическом тестировании использовали неосветленные экстракты листьев здорового и инфицированного растения. Тест-полоска длиной 6–7 см и шириной 5 мм для проточного латерального иммуноанализа представляет собой мультимембранный композит, на котором в виде узких поперечных зон фиксированы первичные и вторичные антитела для обнаружения вируса. Для мультимембранного композита в иммунохроматографии использовали мембранные фильтры фирмы MDI (Индия).

Движение анализируемого сока (экстракта) вдоль полоски происходит за счет капиллярной диффузии. В стартовой области полоски вслед за зоной нанесения или погружения наносится конъюгат первичных антител с визуально-детектируемым коллоидным золотом (рис. 1). В ходе анализа зараженного образца в аналитической зоне ИХТС формируется окрашенный тройной комплекс (иммобилизованные антитела—определяемый вирус—конъюгат первичных антител с коллоидным золотом) в виде узкой зоны, которую можно легко регистрировать визуально. В отсутствие вируса в анализируемом растительном экстракте меченные коллоидным золотом антитела свободно проходят через зону иммобилизованных на мембране антител к вирусу и окрашенная полоса образуется только в контрольной зоне. Оценку результатов иммунохроматографии проводили визуально сравнением анализа опытных и контрольных образцов. Наличие окрашенной полосы в контрольной зоне свидетельствует о работоспособности тест-полоски.

Результаты

Применение ИХТС для диагностики наиболее опасных для картофелеводства инфекций вирусом Y и ВСЛК показано на рис. 2. Появление окрашенной

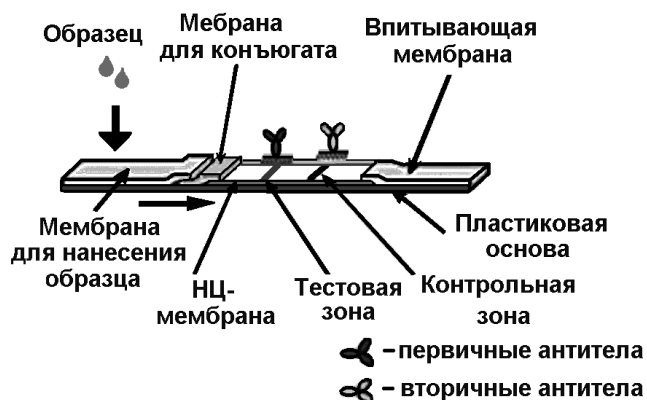


Рис. 1. Внешний вид ИХТС для экспресс-детекции целевых антигенов

аналитической зоны и отсутствие окраски в образце здорового растения или инфицированного другим (PVX — Potato virus X) вирусом (рис. 2а) указывает на достаточную чувствительность диагностики и ее специфичность. При этом время анализа занимает 2–15 мин, а объем анализируемой пробы листа или проростка клубня (сок или экстракт растительной ткани) не превышает 100 мкл.

Поскольку ВСЛК накапливается во флоэме растений в небольших количествах, что затрудняет его выделение и изучение, а тем более, получение антител к нему, нами была создана рекомбинантная ДНК, состоящая из кДНК палочковидного тобамовируса (crTMV — crucifer-infecting Tobacco Mosaic Virus), в которой ген белка оболочки был замещен на ген капсидного белка ВСЛК, стоящий под сильным промотером. Эта ДНК была вставлена в бинарный вектор. Растения *N. benthamiana* заражались вектором с помощью агроинфильтрации, в результате в зараженном растении синтезировались РНК, транспортный белок тобамовируса и белок оболочки ВСЛК. При этом образовавшийся химерный вирус, состоящий из РНК спирального тобамовируса и белка оболочки ВСЛК (целевого антигена), был инфекционен и распространялся по сосудистой системе растения.

При выделении выход химерного вируса из зараженного растения в трех повторных выделениях был в среднем в 800 раз больше по сравнению с выходом природного штамма ВСЛК. Это обстоятельство позволило получить антитела к химерному вирусу, основной антиген которого — капсидный белок — идентичен природному белку оболочки. Важно отметить, что реплицированная РНК спирального тобамовируса упаковывалась капсидным белком ВСЛК в икосаэдрический вирион. Более того, антитела к дикому типу ВСЛК узнавали химерный вирус с той же чувствительностью, что и природный изолят [14]. Полученные нами антитела к химерному вирусу узнавали природный изолят ВСЛК (рис. 2б). Независимо эти результаты были подтверждены методом твердофазного иммуноферментного анализа.

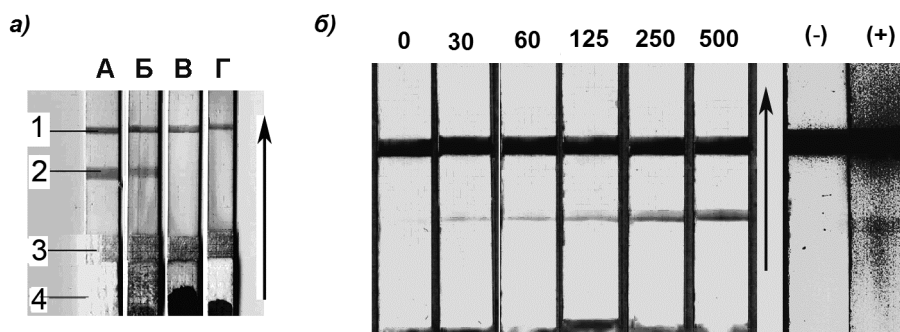


Рис. 2. а — иммунохроматографический анализ картофеля на зараженность вирусом Y. А — препарат вируса Y картофеля, 1 мкг/мл, (+)контроль. Б — экстракт из листьев зараженного картофеля; (анализ). В — экстракт из листьев здорового растения картофеля, (-)контроль. Г — экстракт из листьев картофеля, зараженного вирусом X картофеля, (-)контроль. 1 — контрольная область (вторичные); 2 — аналитическая область (первичные); 3 — область нанесения конъюгата первичных IgG-Au; 4 — зона нанесения анализируемой пробы или погружения в нее тест-полоски. Стрелка указывает направление хроматографии. б — определение вируса скручивания листьев картофеля в соке листа картофеля. В анализируемую пробу добавлено слева направо 0 → 500 нг химерного вируса. (-) — здоровое растение, (+) — картофель, зараженный диким типом вируса ВСКЛК

Получение диагностических антител к ВСКЛК является сложной задачей в связи с необходимостью использования тлей для заражения растений и его малым накоплением в растении. Эти трудности были преодолены с помощью созданного нами бинарного вектора, который после агроинокуляции табака вызывает образование инфекционного химерного вируса. Из 20 г листьев мы получали 8–10 мг вирусных частиц, подобных природным вирионам ВСКЛК.

Обсуждение результатов

В России и странах СНГ в настоящее время массовая диагностика вирусных инфекций растений осуществляется в основном с помощью технологии твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Методы этой технологии позволяют количественно определять до 1 нг/мл вирусов в экстрактах листового материала. Однако они занимают много времени, для их использования необходим квалифицированный персонал и требуется дорогостоящее оборудование, что ограничивает область их применения специализированными лабораториями.

Молекулярная диагностика вирусных инфекций на практике предполагает массовую диагностику (сотен или даже тысяч образцов), которая должна сочетать в себе избирательность определения целевого патогена, чувствительность, достаточную для выявления вируса (вириода) в полевом материале, производительность, удовлетворяющую экономике сельскохозяйственного производства, скорость, необходимую в экстренных случаях при массовых инфекциях (при эпифитотиях) и доступность, ценовую и эксплуатационную.

В семеноводческих хозяйствах ежегодная диагностика инфекций картофеля должна проводиться как на стадии производства предбазисного мате-

риала (пробирочные растения, черенки, микроклубни), так и при отборе здоровых растений в полевых условиях. Именно отсутствие систематической диагностики зараженности картофеля привело к тому, что в России картофель в разной степени, но повсеместно, заражен фитопатогенами. По разным источникам смешанные вирусные, виroidные, микробные и грибковые инфекции приводят к потерям урожая картофеля в поле до 70%.

Повсеместный массовый мониторинг зараженности посевного и полевого материала растений вирусами возможен только на основе простых, надежных, высокоспецифичных и высокочувствительных экспресс-методов, применимых для широкого круга вирусов, позволяющих проводить экспресс-диагностику в полевых условиях без специальных навыков и оборудования. Одним из основных коммерческих требований, предъявляемых ко всем современным методам внелабораторной иммунодиагностики (используемых в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве), является полная готовность набора к проведению анализа. Такой набор должен включать все необходимые реагенты.

Сегодня наиболее быстрой и простой технологией молекулярной диагностики вирусных заболеваний картофеля является иммунохроматография на тест-полосках. Во всех случаях анализ проводится до появления сигнала в контрольной зоне. Для проведения анализа с помощью ИХТС достаточно лишь добавить каплю сока анализируемого растения, что инициирует иммунохимическое взаимодействие и формирование регистрируемого сигнала в контрольной и аналитической областях. Идеальным в таких тест-системах является использование меток (окрашенные латексы, красители, коллоидное золото, липосомы с красителем, углеродные частицы и т.д.), позволяющих проводить анализ путем простого визуального считывания. Например, чувствительность определения

вируса табачной мозаики в неосветленном соке листьев табака, разбавленном в 10 раз, составляет 1 нг/мл, а полное время анализа — 2 мин [11].

Чувствительность определения вирусов Y, S и M картофеля разработанными нами ИХТС находится в пределах 10–50 нг/мл. С помощью ИХТС удается определить 30 и более наногрaмм ВСЛК и вируса Y картофеля (рис. 2). Здесь необходимо отметить три обстоятельства. Во-первых, как и в других иммунологических тестах, чувствительность диагностики инфекции определяется препаратами антигена и полученными к нему антителами, и здесь иммунохроматографический метод лишь немного уступает ИФА. Во-вторых, проточный латеральный иммуноанализ является полуколичественным методом и чаще всего используется для получения ответа в формате “да-нет”, ИФА же является строго количественным методом. Необходимо оговориться, что в последнее время в лаборатории Б.Б. Дзантиева (ИНБИ имени А.Н. Баха РАН) разработаны лабораторные и полевые рефлектометры для количественной оценки результатов иммунохроматографического анализа. И, наконец, главное, чувствительность ИХТС более чем достаточна для диагностики системной вирусной инфекции. Для ранней стадии инфекции, или если вируса в растении накапливается мало, например, в случае флeзмo-ограниченных вирусов, чувствительности иммунологических методов может и не хватить.

На основании опыта создания и использования систем для молекулярной диагностики вирусных инфекций картофеля можно заключить, что для массового анализа вирусных заболеваний исходного семенного материала экономически целесообразно использовать двухэтапный подход [15, 16]. На первом этапе выгодно использовать высокопроизводительный и доступный даже в полевых условиях экспресс-метод диагностики. Наиболее пригоден здесь иммунохроматографический метод на тест-полосках в формате “да-нет”, с помощью которого отбраковывается явно зараженный материал. Массовый скрининг (сотни образцов) семенного картофеля на зараженность вирусами Y и X при отборе базовых клонов в банке здоровых сортов был проведен этим методом нами совместно с НИИКХ Россельхозакадемии. Для проверки за-

раженности сортообразцов картофеля вирусами X, Y, M, S и ВСЛК все пробы готовили одним и тем же способом. Соответствие результатов выявления вирусов картофеля с помощью ИФА и ИХТС составило для вируса Y — 89%, а для вируса X — 100%, для здоровых растений было получено 100%-ное совпадение результатов.

На втором этапе для анализа оставшихся растений надо использовать либо ИФА, либо наиболее чувствительную диагностическую технологию полимеразной цепной реакции, в том варианте ОТ-ПЦР, который доступен лаборатории. Более достоверный диагноз можно поставить методом ПЦР в реальном времени или гнездовой ПЦР с необходимыми положительным и отрицательным контролями. Такой прошедший двухэтапный отбор семенной материал подлежит размножению и гарантирует высокий урожай в поле при подходящих климатических условиях. Обязательной является ежегодная полевая массовая диагностика инфекций семенного картофеля.

Таким образом, в настоящей работе разработаны ИХТС для молекулярной экспресс-диагностики инфекций картофеля вирусом Y и ВСЛК. На основании опыта создания систем для определения растений, инфицированных вирусами, предлагается тактика рационального применения молекулярного диагностического анализа на практике.

На очереди стоит разработка прототипов ИХТС для диагностики вирусных инфекций, наносящих большой экономический ущерб, у других овощных культур России. Дальнейшее развитие иммунохроматографического анализа возможно путем создания иммуночипов как для определения круга вирусов отдельных районированных культур растений: овощных, ягодных, косточковых и т.д., так и для наиболее экономически опасных представителей фитопатогенов, наносящих ущерб в данном регионе.

Авторы благодарят сотрудников ВНИИКХ имени А.Г. Лорха Б.В. Анисимова, Ю.А. Варицева и А.И. Ускова за иммунореагенты и коллег из ЗАО НВП “Иммунотех” МГУ имени М.В. Ломоносова за сотрудничество в разработке ИХТС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дрыгин Ю.Ф. Детекция целевой последовательности нуклеотидов и целевого антигена // 8-я Всероссийская научно-практическая конференция “Молекулярная диагностика 2014” / М: МБА, 2014. С. 126.
2. Drygin Yu.F., Chirkov S.N., Kondakova O.A., Zinovkin R.A., Ivanov P.A., Blintsov A.N., Gavryushina E.S., Zherdev A.V., Byzova N.A., Dzantiev B.B., Atabekov J.G. High-sensitive technologies for molecular diagnostics of potato virus

and viroid infections // Potato Production and Innovative Technologies / Eds. A.J. Haverkort and B.V. Anisimov. Wageningen: Acad. Publishers, 2007. P. 274–285.

3. Кондакова О.А., Дрыгин Ю.Ф. Диагностика вирусного заболевания картофеля зондами (диен)Рt-ДНК // Биотехнология. 1999. № 4. С. 83–90.

4. Дрыгин Ю.Ф., Кондакова О.А., Чирков С.Н., Зиновкин Р.А., Киселева В.И., Атабеков И.Г. Способ одно-

временного обнаружения множества РНК-последовательностей в биологическом образце. Международный патент #WO/2009/123494.

5. Takanami Y., Kubo S. Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll // J. Gen. Virol. 1979. Vol. 44. N 1. P. 153–159.

6. Weller M.G. Immunochromatographic techniques — a critical review // Fresen. J. Anal. Chem. 2000. Vol. 366. N 6. P. 635–645.

7. Posthuma-Trumpie T., Korf J., van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threat. A literature survey // Anal. Bioanal. Chem. 2008. Vol. 393. N 2. P. 569–582.

8. Zhang G., Guo J., Wang X. Immunochromatographic lateral flow strip tests // Biosensors and Biodetection. Methods and Protocols / Eds. A. Rasooly and K.E. Herold. NY: Humana Press, 2009. P. 169–183.

9. Wong R., Tse H. Lateral flow immunoassay. NY: Humana Press, 2009. 223 p.

10. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis // Trends Anal. Chem. 2014. Vol. 55. P. 81–93.

11. Drygin Y.F., Blintsov A.N., Osipov A.P., Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Uskov A.I., Varitsev Y.A., Anisimov B.V., Novikov V.K., Atabekov J.G. High-sensitivity express immunochromatographic method for detection of plant infection by

tobacco mosaic virus // Biochemistry (Mosc.). 2009. Vol. 74. N 9. P. 986–993.

12. Drygin Yu. F., Blintsov A. N., Grigorenko, V.G., Andreeva I.P., Osipov A.P., Varitsev Y.A., Uskov A.I., Kravchenko D.V., Atabekov J.G. High sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 93. N 1. P. 179–189.

13. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантеев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. С. 288.

14. Дрыгин Ю.Ф., Скурят Е.В., Кондакова О.А., Атабеков И.Г., Бутенко К.О. Способ получения препаративных количеств вирусных частиц флоэмно-ограниченных вирусов. Патент РФ: 2555534 от 08.06.2015 г.

15. Дрыгин Ю.Ф. Стратегия и тактика молекулярной диагностики инфекций картофеля на практике // Второе научно-практическое совещание “Генетические и агротехнологические ресурсы повышения качества продовольственного и технического картофеля”. М.: МГУ, 2012. С. 10–11.

16. Бутенко К.О., Скурят Е.В., Кондакова О.А., Варицев Ю.А., Гаврюшина Е.С., Дрыгин Ю.Ф., Атабеков И.Г. Полевой метод диагностики инфекции картофеля вирусом скручивания листьев на тест-полосках с антителами к химерному вирусу // Защита картофеля. 2014. Т. 1. № 1. С. 35–36.

Поступила в редакцию
24.07.15

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF POTATO INFECTIONS WITH PVY AND PLRV BY IMMUNOCHROMATOGRAPHY

O.A. Kondakova¹, K.O. Butenko¹, E.V. Skurat¹, Yu.F. Drygin^{2,*}

¹ Department of Virology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leninskiye gory 1–40, Moscow, 119992, Russia;

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

Immunochromatography test systems were developed for molecular diagnostics of the potato virus Y and PLRV infection. To increase a low yield of PLRV and raise antibodies against the PLRV antigen, chimerical virus was constructed comprising the PLRV coat protein and recombinant RNA of a tobamovirus, in which capsid protein gene was replaced by the PLRV coat protein gene. Binary vector containing the DNA copy of the recombinant RNA was infectious, and yield of the chimerical virus increased up to 800 times in comparison with the WT PLRV. On the basis of experience in the development of the diagnostics of viral and viroid infections, a rational tactics is proposed for the mass laboratory and field diagnosis of viral infections on the molecular level.

Key words: potato virus Y, potato leafroll virus, chimerical PLRV virus, immunochromatography, infection, molecular diagnostics.

Сведения об авторах:

Кондакова Ольга Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-08; e-mail: olgakond@yandex.ru

Бутенко Константин Олегович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-29; e-mail: k002@yandex.ru

Скурят Евгений Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-47; e-mail: skurat@genebee.msu.ru

Дрыгин Юрий Федорович — докт. хим. наук, зав. лабораторией нуклеиново-белковых взаимодействий НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-29; e-mail: drygin@belozersky.msu.ru