

به کارگیری روش‌های مختلف تأیید انجام واکنش RT-LAMP جهت

تشخیص ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV)

محمد امین الماسی^{۱*}، علی حق نظری^۲، ابوبکر مرادی^۳، اسماعیل صابر فر^۴

۱ و ۳- به ترتیب کارشناس ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۴- استادیار دانشگاه دانشکده پزشکی بقیه الله

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: amination66@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

رنگ‌های فلورسنت

کدورت

واکنش RT-LAMP

واکنش RT-PCR

ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV)

بیماری پیچیدگی برگ سیب زمینی، از بیماری‌های مهم در مزارع سیب زمینی است که باعث کاهش عملکرد و کیفیت غده‌های سیب زمینی می‌شود. این بیماری توسط ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی ایجاد می‌شود. یکی از روش‌های اولیه مدیریت آلودگی در محصولات سیب زمینی، استفاده از غده‌های عاری از ویروس به عنوان غده بذری برای کاشت است. روش‌های متعددی جهت تشخیص این ویروس وجود دارند که می‌توان به آزمون‌های سرولوژیک و روش‌های مولکولی اشاره کرد. روش RT-LAMP روش جدیدی جهت تشخیص پاتوژن‌ها است که در این پژوهش جهت تشخیص ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی به کار گرفته شد. به منظور انجام آزمون سرولوژیک، نمونه‌های برگ با علایم مشابه به ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی از سطح استان زنجان جمع‌آوری شدند. جهت انجام آزمون‌های مولکولی، آر.ان.ا. کل استخراج و واکنش RT-LAMP صورت گرفت. سپس روش‌های مختلفی جهت تأیید انجام این واکنش استفاده شدند و واکنش مثبت با دیدن کدورت حاصله، بارگذاری محصول بر روی ژل آگارز و استفاده از رنگ‌های فلورسنت سایبرگرین و اتیدیوم بروماید تأیید شد. از مزایای این روش جدید در مقایسه با سایر روش‌های پیشین می‌توان به سرعت (۷۵ دقیقه)، سهولت و ایمنی آن اشاره کرد.

مقدمه

سیب‌زمینی چهارمین محصول مهم دنیا بعد از برنج، گندم و ذرت است که همواره با چندین ویروس در خلال فصل رشد آلوده می‌شود. این ویروس‌ها می‌توانند به صورت مخلوط یا مجزا در مزرعه نمایان شوند (Agindotan et al. 2007). ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی یا Potato leafroll virus (PLRV) که با نام‌های ویروس لوله‌ای شدن برگ، نکروز بافت آبکشی و نکروز شبکه‌ای سیب‌زمینی نیز شناخته شده است، ویروسی از خانواده Luteoviridae و جنس Polerovirus است (Gildow et al. 2000). اعضای خانواده Luteoviridae طیف وسیعی از گیاهان دو لپه‌ای و تک لپه‌ای را آلوده می‌کنند و اغلب در بافت آبکشی تکثیر می‌یابند (Johannes et al. 1994). دامنه میزبانی این ویروس به طور عمده به چند گیاه از جنس سولاناسه یعنی *Physalis oridana*, *Solanum tuberosum* محدود می‌شود (Guyader et al. 2002). ویروس PLRV سبب پیچیدگی برگ، کلروز و کوتاه‌قدی در گیاهان می‌شود. همچنین در بعضی واریته‌ها سبب علامت تیپیکی به نام نکروز شبکه‌ای می‌شود که سبب مرگ انتخابی و آسیب سلول‌ها در بافت آبکشی غده‌ها می‌شود (Alvarez et al. 2005). این ویروس از طریق پیوند، کاشت غده آلوده و شته‌ها منتقل می‌شود اما با عصاره گیاهی نمی‌تواند انتقال یابد. انتقال توسط شته به طریق پایا و چرخه‌ای به وسیله تغذیه از آوند آبکشی صورت می‌گیرد (Guyader et al. 2002). شته‌هایی مانند شته سبز هلو (*Myzus persicae*)، شته سیب‌زمینی (*Macrosiphum euphorbiae*) و شته پنجه روباهی (*Acyrtosiphon solani*) از مهم‌ترین ناقلین این ویروس به شمار می‌روند (Singh et al. 1995). ژنوم این ویروس یک آر.ان.ا. سنس پیام‌رسان تک رشته‌ای است که دارای یک پروتئین متصل شده به ژنوم (VPg) است (Zhang et al. 2011).

جهت کنترل این بیماری، اولین قدم تشخیص ویروس است و از آنجایی که علائم بیماری‌های ویروسی به هم شباهت زیادی دارند، تشخیص دقیق و درست ویروس مورد نظر در امر کنترل مهم است. روش‌های بر پایه آنتی‌بادی به‌ویژه الایزا، آنتی بادی‌های مونوکلونال یا پلی‌کلونال یا ترکیبی از هر دو را به کار می‌گیرند.

تأمین کیفیت بالای آنتی سرم جهت اطمینان از آزمایش‌های مهم است اما باید توجه داشت که خالص‌سازی مواد کافی برای تولید آنتی‌سرم، زمان‌بر و پرهزینه است. اولین موفقیت در تهیه آنتی‌سرم برای PLRV توسط کوچیما و موری یاما گزارش شد که توانستند آنتی‌سرم نسبتاً خالصی را بدست آورند (Al-mrabeh et al. 2009). بعد از آن آزمون‌های مختلفی با این روش توسط پژوهشگران صورت پذیرفت. روحانی و استاک-اسمیت (Rowhani & Stace-Smith)، با این روش توانستند خصوصیات این ویروس را مشخص کنند (Rowhani et al. 1979). المرابه (Al-Mrabeh) و همکارانش، روش الایزای نوترکیب را با استفاده از آنتی‌بادی نوترکیب V3HCL که با بیوتین نشاندار شده بود، جهت تشخیص PLRV به کار گرفتند و نشان دادند که نتایج حاصل از این روش نسبت به الایزای معمولی دقیق‌تر است (Al-mrabeh et al. 2009). در سال‌های اخیر استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص ویروس‌ها، به‌ویژه برای گواهی غده‌های بذری توسعه یافته است. (Klerks et al. 2001). گیلدو (Gildow) و همکارانش، روش Northern blotting را برای تشخیص این ویروس به کار گرفتند و با استفاده از انتقال آر.ان.ا. استخراج شده از شته‌های ناقل و گیاهان آلوده به غشای نایلونی و نشاندار کردن با نشانگر توانستند بعد از عکس‌برداری، ویروس را تشخیص دهند (Gildow et al. 2000). بیشتر ویروس‌های مهم سیب‌زمینی دارای ژنوم از نوع RNA هستند. بنابراین ساخت رشته مکمل دی.ان.ا. (cDNA) توسط آنزیم نسخه‌برداری معکوس، در گذشته برای تشخیص این نوع از ویروس‌ها با استفاده از RT-PCR به کار رفته است (Nie 2006). سینگ (Singh) این روش را برای تشخیص PLRV به کار گرفت (Singh et al. 1995). با این وجود روش RT-PCR چندین عیب مشخص مانند نیاز به ترموسایکلر و مواد خطرناک آشکارساز دارد (Fukuta et al. 2003). روش Real-time RT-PCR روشی مؤثر برای تشخیص عوامل بیماری‌زا است، اما نیاز به تجهیزات و مواد شیمیایی گران قیمت دارد (Caipang et al. 2009). مورتیمر-جونز (Mortimer-Jones) و همکارانش این روش را برای تشخیص PLRV به کار گرفتند و دریافتند که با این روش می‌توان پی به کمیست دی.ان.ا. برد (Mortimer-Jones et al. 2009). روش

محل نمونه‌برداری در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-آزمون سرولوژیک

به‌منظور شناسایی ویروس PLRV، آزمون سرولوژیک بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آنتی‌سرم چند همسانه‌ای PLRV (تهیه شده از مؤسسه Bioreba سویس) به روش الایزای ساندویچی (DAS-ELISA) و بر اساس روش کلارک و آدامس (Clark & Adams) انجام شد (Clark *et al.* 1977). مقدار ۰/۱ گرم بافت برگ در هاون چینی با یک میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری، عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل تا زمان ریختن در چاهک‌های پلیت در یخچال نگهداری شد. ابتدا (IgG) مورد نظر به نسبت توصیه شده توسط کمپانی سازنده (۱/۱۰۰۰) در بافر پوششی رقیق و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آن در چاهک‌های پلیت ریخته شد. پلیت به مدت دو الی چهار ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت زمان لازم پلیت تخلیه و سه بار (هر بار به مدت سه دقیقه) با بافر شستشو شسته شد. سپس پلیت به‌طور کامل خشک شد و به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های گیاهی از قبل آماده شده شامل نمونه‌های شاهد مثبت (ایزوله PLRV-C تهیه شده از مؤسسه Bioreba سویس)، شاهد منفی (نمونه فاقد ویروس تهیه شده از مؤسسه Bioreba سویس) و بافر عصاره‌گیری در چاهک‌ها ریخته شد. پلیت موردنظر به مدت یک شب در چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. روز بعد پلیت به روش ذکر شده در قبل شسته و این بار پس از خشک کردن کامل پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای متصل شده به آنزیم آلکالین فسفاتاز رقیق شده در بافر Conjugate به چاهک‌ها اضافه و پس از آن پلیت به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. پس از شستشو و خشک کردن پلیت همانند قبل مقدار ۶/۵ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات را که سوبسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز است در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر سوبسترا حل کرده و به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. برای مشاهده تغییر رنگ پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه تغییر رنگ چاهک‌ها با چشم غیرمسلح بررسی و مشاهده شد.

AmpliDet RNA multiplex توسط کلرکس (Klerks) و همکارانش جهت تشخیص PLRV در سیب‌زمینی‌های بذری به کار گرفته شد. در این روش خطر آلودگی در خلال تشخیص به دلیل انجام واکنش در تیوب در بسته حذف می‌شود و وجود ویروس در نمونه‌ها با استفاده از نشانگرهای رنگی انتخاب شده برای یک توالی خاص صورت می‌گیرد (Klerks *et al.* 2001). اخیراً توانایی سیستم تکثیر بر پایه توالی اسیدنوکلئیک (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) برای تشخیص مستقیم PLRV در غده‌های سیب‌زمینی نیز ثابت شده است که قادر به تشخیص حساس‌تر و سریع‌تر در مقایسه با تکنیک‌های استفاده شده قبلی است (Leone *et al.* 1997). روش LAMP توسط نوتومی (Notomi) و همکارانش معرفی شده، قادر است اسیدنوکلئیک را با کارایی بسیار زیاد در یک دما (۶۵-۶۰) با اختصاصیت بالا تکثیر کند. در این روش از ۴ آغازگر اختصاصی که ۶ ناحیه مشخص از توالی ژن هدف را شناسایی می‌کنند، استفاده می‌شود. آنزیم مورد استفاده در این روش، *Bst* DNA پلیمراز است که دارای خاصیت جایگزینی رشته و مقاوم به حرارت است (Nagamine *et al.* 2002; Notomi *et al.* 2000). در این پژوهش روش RT-LAMP برای تشخیص این ویروس برای اولین بار انجام شد. تأیید انجام واکنش علاوه بر کدورت حاصل از تشکیل رسوب پیروفسفات منیزیم، توسط بردن محصول بر روی ژل آگارز و استفاده از رنگ‌های فلورسنت SYBR[®] Premix Ex Taq[™] I و اتیدیوم بروماید نیز صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- نمونه‌برداری و نحوه انتخاب نمونه‌ها

طی سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ از مناطق عمده سیب‌زمینی کاری استان زنجان، نمونه‌برداری به‌عمل آمد و برگ بوته‌های با علایمی مانند زردی برگ، لوله‌ای شدن برگ، کاغذی شدن برگ و کوتولگی بوته، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. به علت حضور ویروس در آوند آبکش، در مورد هر بوته مشکوک به بیماری، ساقه‌های منتهی به برگ و برگ‌ها جمع‌آوری شدند. تعداد ۱۴۵ نمونه برگ در کیسه‌های پلاستیکی به طور جداگانه و با ذکر

۳- استخراج آر.ان.ا. کل از برگ‌های سیب‌زمینی آلوده

استخراج آر.ان.ا. کل به روش روحانی (Rowhani) و همکارانش انجام شد (Rowhani et al. 1979). در پایان مرحله استخراج، رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (شرکت سیناژن، ایران) حل شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا قبل از استفاده قرار گرفت.

۴- آزمون RT-LAMP

طراحی آغازگرها جهت انجام تست RT-LAMP بر اساس ژن پوشش پروتئینی (CP) ویروس موردنظر با شماره شناسایی Genbank: U73777.1 و با استفاده از نرم‌افزار PrimerExplorer V3 (نرم‌افزار online ویژه جهت طراحی آغازگرهای LAMP) صورت گرفت (جدول ۱). واکنش RT-LAMP به‌طور همزمان و یک مرحله‌ای با استفاده از آر.ان.ا. به‌عنوان الگو در یک تیوب انجام شد. شاهد مثبت (آر.ان.ا. ایزوله PLRV-C تهیه شده از

مؤسسه Bioreba سویس) و شاهد منفی (RNA کل بافت برگ گیاه سیب‌زمینی عاری از ویروس تهیه شده از مؤسسه Bioreba سویس) بودند. لازم به توضیح است که ایزوله ویروس موردنظر ایزوله کانادایی (PLRV-C) بود و از آنجا که تشخیص بر اساس ژن بسیار حفاظت شده پوشش پروتئینی صورت می‌گرفت که در کل ایزوله‌ها وجود داشت، نوع ایزوله دارای اهمیت چندانی نبود. جهت انجام واکنش در ابتدا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۰۲ میلی‌مولار RNA کل، ۰/۰۴ میلی‌مولار dNTP، ۰/۰۲ میلی‌مولار DDT، ۰/۰۲ میلی‌مولار RNasin، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر FIP، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر BIP، ۰/۰۴ میلی‌مولار آغازگر، ۰/۰۴ میلی‌مولار آغازگر LB، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر F3، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر B3، ۰/۰۸ میلی‌مولار بتایین، ۰/۰۴ میلی‌مولار $MgSO_4$ ، ۰/۱ میلی‌مولار بافر Bst(10X) و ۰/۱ میلی‌مولار آب استریل) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت و بعد از این مدت ۰/۲ میلی‌مولار آنزیم

جدول ۱- آغازگرهای الیگونوکلوئیدی برای ژن پوشش پروتئین ویروس PLRV برای انجام واکنش RT-LAMP.

Table 1- Oligonucleotide primers used for RT-LAMP of coat protein gene of PLRV

Primer آغازگر	Type نوع	Position موقعیت	Length طول	Sequence توالی
F3	Forward outer پیشرو خارجی	61-78	18 nt	AGAAGGCAATCCCTTCGC
B3	Backward outer پسرو خارجی	245-264	20 nt	GGTGAAACTTCCTGGGTGT
FIP	Forward inner پیشرو داخلی	139-159 and 79-96	43 nt	GCCTCCTCTTCTGCGTCTTCG TTTAGGCGCGCTAACAGAGT T
BIP	Backward inner پسرو داخلی	161-182 and 223-241	45 nt	ATCGCCGCTCAAGAAGAACT GGTTTCCACGAGGTTGTCCT TTGT
LF	Loop forward outer پسرو حلقه ای خارجی	97-118	22 nt	CCGTGACCATAACCACTGGCT G
LB	Loop backward outer پسرو حلقه ای خارجی	191-210	20 nt	GAGGACGAGGCTCAAGCGAG

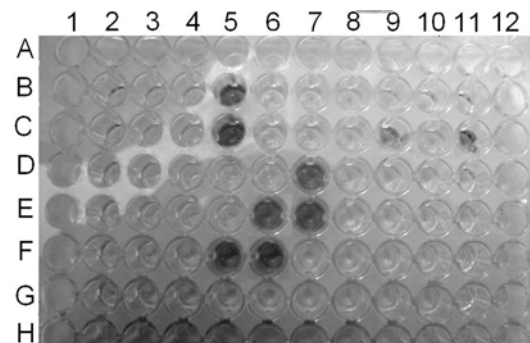
M-Mulv RT و ۰/۰۴ میلی‌مولار آنزیم *Bst* DNA پلیمراز اضافه شد و واکنش در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه ادامه یافت (تمام دماها یک سیکلی بودند). به محض اتمام واکنش تیوب‌ها خارج گشت و کدورت حاصل از واکنش مثبت مشاهده شد. همچنین ۵ میکرولیتر از محصول به همراه یک مارکر نردبانی (Gene Ruler, TM 100bp DNA Ladder) در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه ژل داگ عکس‌برداری شد. علاوه‌براین جهت تأیید انجام واکنش RT-LAMP، از رنگ فلورسنت SYBR[®] Premix Ex TaqTMI (ساخت شرکت تاکارا، ژاپن) نیز استفاده شد. از این رنگ مقدار ۵μl به ۱۰μl از محصول واکنش RT-LAMP اضافه شد و بعد از یک ورتکس کوتاه، تیوب‌ها زیر نور UV قرار داده شدند. واکنش مثبت با تغییر رنگ از قرمز به سبز مشاهده شد. واکنش مثبت با بکارگیری رنگ اتیدیوم بروماید به روش توضیح داده شده توسط تسایی (Tsai) و همکاران نیز تأیید شد (Tsai et al. 2009). مقدار ۱μl از رنگ اتیدیوم بروماید بهینه شده به ۲۵μl از محصول اضافه شد و تیوب‌ها زیر نور UV قرار داده شدند.

نتایج و بحث

بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها، در اولین قدم جهت تشخیص نمونه‌های آلوده به ویروس و اطمینان از حضور ویروس در آنها، آزمون الیزا انجام شد و از بین نمونه‌های آزمایش شده، دو نمونه مثبت مشخص شد که بر اساس شماره‌ای که از قبل داده بودیم، PLRV10 و PLRV16 بودند (شکل ۱). مشاهدات چشمی با توجه به رنگ نمونه‌ها نشان دهنده غلظت بالای ویروس در نمونه‌ها بود و به علت وضوح بالای تغییر رنگ در نمونه‌ها، عملاً نیازی به استفاده از دستگاه ELISA Reader نبود. این نتایج مشابه با نتایج بدست آمده توسط دیگر پژوهشگران بود (Al-Rowhani et al. 1979; Leone et al. 1997; mrabeh et al. 2009). روش الیزا یک آزمون سرولوژیک بر پایه اتصال آنتی‌بادی و آنتی‌ژن است که هزینه بالای تهیه آنتی‌سرم یکی از مشکلات این روش است. علاوه بر این، روش حاضر نیاز به دقت بالایی دارد

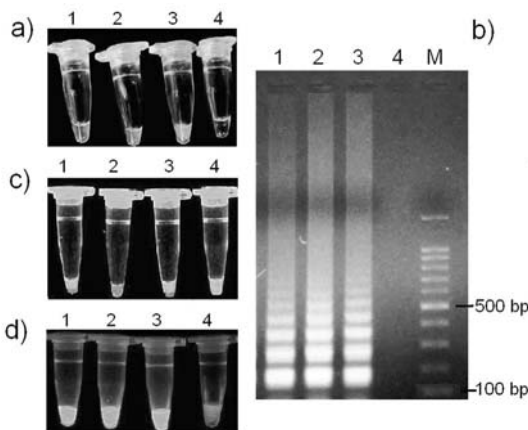
به گونه‌ای که هر اشتباه کوچکی به هنگام انجام آن موجب اخلال در کار می‌شود. زمان‌بر بودن یکی دیگر از معایب این روش است به‌طوری که نیاز به ۲ روز کار مداوم و پشت سرهم دارد. شاید بتوان گفت یکی از برتری‌های این روش عدم نیاز به استخراج آران‌ا است. واکنش RT-LAMP یک مرحله‌ای نیز با استفاده از آران‌ا به‌عنوان الگو انجام شد. واکنش مثبت با خارج کردن تیوب‌ها و دیدن کدورت حاصل شده تأیید شد (شکل ۲a). طبق بررسی انجام شده توسط نوتومی (Notomi) و همکارانش، در واکنش LAMP مقدار ۱۰ میکروگرم یا بیشتر، دی‌ان‌ا در ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش تولید می‌شود، بنابراین یون پیروفسفات تولید شده با منیزیم واکنش داده و رسوب ایجاد می‌کند که به دنبال آن کدورت مشاهده می‌شود. در حالی که عملکرد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در تولید دی‌ان‌ا ۰/۲ میکروگرم در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش است و در نتیجه میزان یون پیروفسفات به حدود ۰/۲ میلی‌مولار می‌رسد که در نتیجه قادر به تولید رسوب پیروفسفات منیزیم نیست و بنابراین در تکثیر دی‌ان‌ا بوسیله پی‌سی‌آر هیچ رسوبی مشاهده نمی‌شود. به‌علاوه پیروفسفات در دمای بالا هیدرولیز می‌شود، به همین دلیل در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به علت استفاده از دمای بالا جهت واسرشت سازی پیروفسفات هیدرولیز می‌شود. برخلاف واکنش LAMP که در یک دمای پیوسته (۶۰ درجه سانتی‌گراد) انجام می‌گیرد، در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چرخه‌های دمایی را داریم که خود مانعی جهت انجام واکنش پیروفسفات با منیزیم هستند. همبستگی مثبتی بین سنتز دی‌ان‌ا و کدورت وجود دارد. با افزایش سنتز دی‌ان‌ا در واکنش LAMP، کدورت نیز به صورت خطی افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهشگران نشان داد که کدورت سنجی، نیاز به استفاده از روش‌های تشخیصی را حذف می‌کند که خود این مسئله سبب صرفه‌جویی در هزینه و زمان می‌شود (Nagamine et al. 2002; Notomi et al. 2000). همچنین با بردن محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد و الکتروفورز آن، الگوی نردبانی شکل دیده شد که ناشی از تولید قطعات با اندازه‌های مختلف است (شکل ۲b). کدورت و الکتروفورز، روش‌های تأیید مولکولی برای LAMP هستند زیرا در آغاز واکنش LAMP ایجاد ساختاری با دو

غیراختصاصی در این واکنش، استفاده از این رنگ‌ها مدنظر دانشمندان نیست زیرا به باندهای غیراختصاصی نیز متصل می‌شوند. در حالی‌که در واکنش LAMP به دلیل اطمینان از اختصاصی بودن واکنش و عدم وجود باندهای غیراختصاصی، استفاده از مواد فلورسانس در این واکنش در حال افزایش است. مزیت استفاده از رنگ‌های فلورسنت، عدم نیاز به الکتروفورز بر روی ژل و کاهش زمان تشخیص است. مشاهده کدورت ناشی از رسوب پیروفسفات منیزیم یک روش تشخیص سریع است که سبب بالارفتن سرعت تشخیص (۷۵ دقیقه)، ایمنی بالا، سهولت کار و کاهش هزینه‌ها (عدم نیاز به ترموسایکلر و الکتروفورز) می‌شود. همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش نسبت به



شکل ۱- نتایج آزمون الایزا. به ترتیب چاهک های 5B,7D,6F نمونه های شاهد مثبت (PLRV-C)، چاهک های 6D,9F,8E نمونه های شاهد منفی، چاهک های 5C,5F,7E نمونه های PLRV10 و چاهک های 6E,9C,11C نمونه های PLRV16 هستند.

Figure 1- The results of ELISA assay. The slots are respectively: 6F, 7D and 5B positive control (PLRV-C); 8E, 9F, and 6D negative control; 7E, 5F and 5C PLRV10; 11C, 9C and 6E PLRV16.



شکل ۲- تأیید انجام واکنش RT-LAMP. (a) کدورت حاصل از تشکیل رسوب پیروفسفات منیزیم (b) نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل آگارز (c) استفاده از رنگ فلورسانس SYBR[®] (d) استفاده از رنگ فلورسانس اتیدیوم Premix Ex TaqTM I. خطوط و تیوب ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب نمونه PLRV-C، PLRV10، PLRV16 و نمونه عاری از ویروس و M مارکر ۱۰۰bp هستند.

Figure 2- Confirm of RT-LAMP reaction. (a) Electrophoresis of the RT-LAMP product on agarose gel (b) Turbidity due to the formation of precipitate of magnesium pyrophosphate. (c) Using Ethidium Bromide fluorescence dye. (d) Using SYBR[®] Premix Ex TaqTM I fluorescence dye. Lines and tubes 1, 2, 3 and 4 are respectively: PLRV-C, PLRV10, PLRV16 and free virus sample; M: 100 bp marker.

حلقه در انتهای قطعه تولید شده بوسیله آغازگرهای FIP و BIP برای ادامه واکنش لازم است و در صورت عدم اتصال حتی یکی از آغازگرها، ساختار حلقه‌ای ایجاد نشده و به دنبال آن واکنش LAMP نیز انجام نمی‌گیرد و در نهایت هیچگونه کدورت و الگوی نردبانی شکل نیز مشاهده نمی‌شود. همچنین از آنجایی که آغازگرها خیلی اختصاصی هستند و با همدیگر در تولید محصول عمل می‌کنند، امکان تولید قطعات غیراختصاصی در این واکنش صفر است و بنابراین کدورت و الگوی نردبانی تأییدی مطمئن در واکنش LAMP هستند (Nie 2006). مشاهده واکنش مثبت با استفاده از رنگ فلورسنت SYBR[®] Premix Ex TaqTM I در زیر نور UV، نشان داد که تیوبی که تکثیر در آن صورت گرفته بود، به رنگ سبز و تیوبی که تکثیری در آن رخ نداده بود قرمز رنگ است (شکل ۲c). این نتایج مشابه با نتایج به دست آمده از زهانگ (Zhang) و همکارانش بود (Zhang et al.2011). واکنش مثبت با اضافه کردن مستقیم اتیدیوم بروماید بهینه شده در زیر نور UV نیز دیده شد که با نتایج تسایی (Tsai) و همکارانش مطابقت داشت (Tsai et al.2009) (شکل ۲d). لازم به توضیح است که رنگ‌های فلورسانس فوق، در واکنش زنجیرهای پلیمرز نیز می‌توانند استفاده شوند اما گاهی به دلیل وجود باندهای

سادگی، سرعت، ایمنی، اختصاصیت بالا، حساسیت بالا و هزینه پایین تاکنون توانسته از جایگاه برتری در مقایسه با دیگر روش‌های تشخیصی برخوردار شود (Nagamine et al. 2002; Notomi et al. 2000).

روش‌های تشخیصی قبلی بیشتر است که آن هم به آغازگرهای بسیار اختصاصی طراحی شده آن مربوط می‌شود. در کل می‌توان گفت که روش LAMP از زمان پیدایش خود از سال ۲۰۰۰ توسط نوتومی (Notomi) به دلیل ویژگی‌های ممتاز خود از جمله

منابع

- Agindotan BO, Shiel PJ, Berger PH. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by taqman® Real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142:1-9.
- Al-mrabeh A, Ziegler A, Cowan G, Torrance L. 2009. A fully recombinant ELISA using in vivo biotinylated antibody fragments for the detection of potato leafroll virus. *Journal of Virological Methods* 159:200-205.
- Alvarez JM, Srinivasan R. 2005. Evaluation of hairy nightshade as an inoculum source for aphid-mediated transmission of potato leafroll virus. *Journal of Economic Entomology* 98:1101-1108.
- Caipang CMA, Kulkarni A, Brinchmann MF, Korsnes K, Kiron V. 2009. Detection of *francisella piscicida* in atlantic cod (*gadus morhua* l) by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction. *The Veterinary Journal* 184:357-361.
- Clark MF, Adams AN. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses *The Journal of General Virology* 34:475-483.
- Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y. 2003. Detection of japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Archives of Virology* 148:1713-1720.
- Gildow FE, Reavy B, Mayo MA, Duncan GH, Woodford JA, Lamb IW, Hay RT. 2000. Aphid acquisition and cellular transport of potato leafroll virus like particles lacking p5 readthrough protein. *Phytopathology* 90:1153-1161.
- Guyader S, Ducray DG. 2002. Sequence analysis of potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *The Journal of General Virology* 83:1799-1807.
- Johannes FJM, Heuvel VD, Verbeek M, Van Der Wilk F. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *myzus persicae* *The Journal of General Virology* 75:2559-2565.
- Klerks MM, Leone GOM, Verbeek M, Heuvel JFJM, Schoen CD. 2001). Development of a multiplex amplidex rna for the simultaneous detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers. *Journal of Virological Methods* 93:115-125.
- Leone G, Schijndel HB, Gemen B, Schoen CD. 1997. Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA. *Journal of Virological Methods* 66:19-27.
- Mortimer-Jones SM, Jones MG, Jones RA, Thomson G, Dwyer GI. 2009. A single tube, quantitative Real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. *Journal of Virological Methods* 161:289-296.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16:223-229.
- Nie X. 2006. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y. *Plant Disease* 89:605-610.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28:e63.
- Rowhani A, Stace-Smith R. 1979. Purification and characterization of potato leafroll virus. *Virology* 98:45-54.
- Singh RP. 1999. A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 83:27-33.
- Singh RP, Kurz J, Boiteau G, Bernard G. 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *Journal of Virological Methods* 55:133-143.
- Tsai SM, Chan KW, Hsu WL, Chang TJ, Wong ML, Wang CY. 2009. Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of ORF virus. *Journal of Virological Methods* 157:200-204.
- Van der wilk F, Huisman MJ, Cornelissen BGC, Huttinga H, Goldbach R. 1989. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. *FEBS Letters* 245:51-56.
- Zhang J, Zhang GH, Yang L, Huang R, Zhang Y, Jia K, Yuan W, Li SJ. 2011. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycobacterium bovis*. *The Veterinary Journal* 187:393-396.