

Statusrapport til Kartofelafgiftsfonden for projektet:

**'Afprøvning af den nye PCR teknik til test for virus i kartoffelknolde til erstatning for den gamle ELISA-teknik'**

Mogens Nicolaisen  
Danmarks JordbrugsForskning  
Afd. f. Plantebeskyttelse

**Forskningscenter Flakkebjerg 14. august 2003**

## **Formål med projektet:**

At sammenligne en ny PCR metode (TaqMan) med den nuværende ELISA metode til virustest ved vinterafprøvningen af læggekartofler.

Testen består af to dele, først en prøveforberedelse og dernæst en TaqMan test, se appendix 1.

Fokus i dette projekt har været på selve TaqMan testen. For en uddybende baggrund for projektet henvises til projektansøgningen.

Projektet har været opdelt i flg. underpunkter:

- a) Indkøring af TaqMan metoden for kartoffel virus Y (PVY) og bladrullevirus (PLRV)
- b) Sammenligning af følsomheden af TaqMan kontra ELISA på kartoffelknolde, herunder fortyndingsrækker af inficerede knolde.
- c) Muligheden for at teste for både PLRV og PVY i én arbejdsgang.
- d) Mulig indflydelse på testsikkerheden af forskellige kartoffelsorter.
- e) En samlet vurdering af metodens pris og kapaciteten af metoden.

ad a)

### **Indkøring af TaqMan metoden for kartoffel virus Y (PVY) og bladrullevirus (PLRV)**

En nærmere gennemgang af de allerede eksisterende TaqMan metoder til detektion af virus i kartoffelknolde viste sig ved projektets start ikke at være optimale, der er siden disse blev udviklet sket en forbedring af TaqMan reagenserne og metoderne. Derfor blev det besluttet af udvikle en nyt TaqMan for både PVY og PLRV.

Der findes flere forskellige kits til TaqMan assays, nogle hvor man skal køre testen ad to omgange (two tube assay) og nogle hvor testen foregår ad en omgang (one tube assay). Vi valgte at koncentrere indsatsen om 'one tube' testen, da denne er meget arbejdsbesparende, samt at risikoen for falske positive (forureninger) er væsentlig mindre ved denne type test. Dog er testen noget dyrere at udføre i materialeomkostninger.

**PVY:**

En test designet til at kunne genkende alle kendte PVY isolater blev udviklet med inficerede blade som testmateriale. Efter afprøvning på blade blev metoden afprøvet på kartoffelknolde med en kendt infektion af PVY (Lyra 90% PVY infektion), hvor vi i indledende forsøg fandt 8 ud af 10 prøver inficerede med TaqMan testen.

De samme knolde blev testet med to forskellige prøveforberedelsesmetoder, uden der blev fundet signifikante forskelle i de to metoders effektivitet.

Da testreagenser til TaqMan testen er ret dyre blev forskellige testvolumener afprøvet. Det anbefalede volumen er 50 µl, vi prøvede 25, 20, 15 og 10 µl og fandt næsten lige så stor pålidelighed ved et volumen på 10 µl.

Stabiliteten af testreagenserne blev undersøgt ved at udpipettere alle testreagenserne i testbakken og fryse dem ned over en weekend. Testen blev derefter udført. Der var ingen markant forskel mellem

disse og frisk præparerede testreagenser. Dette kan have betydning for effektiviteten ved testning af mange prøver, da man kan forberede mange på en gang og derefter teste på et passende tidspunkt.

PLRV:

En test designet til at kunne genkende alle kendte PLRV isolater blev udviklet med inficerede blade som testmateriale. Efter afprøvning på blade blev metoden afprøvet på kartoffelknolde med en kendt infektion af PLRV (100% PLRV infektion, knoldene fra andre forsøg ved Flakkebjerg), hvor vi med TaqMan testen fandt 8 ud af 8 prøver inficerede.

ad b)

### **Sammenligning af følsomheden af TaqMan kontra ELISA på kartoffelknolde, herunder fortyndingsrækker af inficerede knolde.**

PVY:

5 partier af forskellig sort med kendt PVY infektionsprocent blev TaqMan testet. Der blev udtaget 20 knolde af hvert parti og disse blev dobbelt testet ved TaqMan og de samme knolde blev lagt til spiring og ELISA testet.

Tabel 1. Sammenligning af ELISA og PCR resultater i knolde fra 5 sorter. ELISA bedømtes positiv ved en værdi over 0.3. \* ikke alle knolde spirede frem

	% PVY i hele partiet	Antal PVY inficerede ved TaqMan	Antal PVY inficerede ved fremspiring og ELISA
Lyra	90	12/20	11/14*
Bintje	8	0/20	6/18
Nicola	40	5/20	5/16
Spunta	20	3/20	4/18
Ditta	64	15/20	13/17

Tagende det forholdsvist lille antal udtagne prøver i betragtning findes der en nogenlunde god overensstemmelse mellem % infektion og antal positive prøver ved TaqMan. Dog findes generelt flere inficerede ved den traditionelle ELISA metode end ved TaqMan. Dog skal det også tages i betragtning, at der ikke er gjort et stort optimeringsarbejde ved prøveforberedelsesteknikker. F.eks. vil en anden RNA ekstraktionsmetode muligvis give en endnu bedre detektion i TaqMan assayet

### **Fortyndingsrækker:**

Et problem ved fortynding er, at testudslaget ser ud til at være fordelt over en jævn kurve således, at nogle knolde vil give et højt signal mens andre vil give et signal lige over detektionsgrænsen. Disse sidste knolde vil give anledning til et negativt resultat hvis de fortyndes for meget. Derfor vurderes potentialet for at teste flere knolde samtidig for at være ret lavt, da en svagt inficeret knold vil 'forsvinde' hvis den testes sammen med andre knolde. Dog viste undersøgelser, at relativt svagt inficerede knolde stadig kunne detekteres ved en 1:10 fortynding.

PLRV:

Da vi ikke rådede over et stort materiale af inficerede knolde (der fandtes ved Vinterafprøvningen kun meget lav infektion med PLRV, så lav at disse partier ikke kunne bruges i denne afprøvning) kunne vi ikke teste metoden på et så stort materiale som ved PVY. Dog finder vi de indledende forsøg så overbevisende (8 ud af 8 knolde fandtes positive for PLRV), at metoden sandsynligvis kan anvendes i praksis.

ad c)

**Muligheden for at teste for både PLRV og PVY i én arbejdsgang.**

RNA fra PVY inficerede knolde blev blandet med RNA fra PLRV inficerede knolde. Der blev kørt TaqMan assay på dette og vi var istand til at detektere både PLRV og PVY i samme prøve. Dette indikerer, at det er muligt at køre tests for to virus i samme arbejdsgang og dermed opnå en besparelse.

ad d)

**Mulig indflydelse på testsikkerheden af forskellige kartoffelsorter.**

Vi var istand til at detektere PVY i de fem undersøgte kartoffelsorter (se b). Der observeredes dog en forskel mellem de enkelte sorter i overensstemmelse mellem ELISA og TaqMan resultaterne.

ad e)

**En samlet vurdering af metodens pris og kapaciteten af metoden.**

Metodens pris:

Der findes to formater til TaqMan analyse: en 96 prøve bakke og en 384 prøve bakke. Ved Flakkebjerg har vi en maskine til 96 prøver og forsøgene er derfor udført i dette format, men ved analyse af et stort antal prøver kan det være fordelagtigt at anvende maskiner med 384 prøve bakken. Det anbefalede prøvevolumen ved 96 prøve bakken er 50 µl mens vi var istand til at opnå fuldt ud ligeså pålidelige resultater ved brug af 10 µl. For 384 maskinen anbefaler producenten et volumen på 5-20 µl. Det er vores vurdering at der vil kunne køres 5 µl reaktioner på denne maskine, muligvis kan man gå længere ned.

Prisberegning ved prøve volumen 5 µl:

TaqMan one-step RT-PCR master mix reagent kit (20.000 reaktioner)	50.900,-
Hvis hver prøve skal køres dobbelt	5,09
TaqMan MGB probe 50 nmol (40.000 reaktioner)	7.580,-
Hvis hver prøve skal køres dobbelt	0,38
384 well plate 500 stk	19.500,-
Pr. prøve	0,20
Diverse reagenser vurderes til	0,25
<u>Samlet pris pr prøve</u>	<u>2,96</u>
<u>Hvis hver prøve skal køres dobbelt</u>	<u>5,92</u>

Der vil sandsynligvis kunne opnås en betydelig rabat ved kørsel af et stort antal prøver. Der er ikke indregnet priser for prøveforberedelse.

### Kapacitet:

Fra kartoffelpartiet modtages til et svar foreligger går der 1-2 dage.

Selve TaqMan assayet kan, med de rette hjælpemidler, udføres effektivt. Plader med færdigpræpareret mix kan hurtigt laves og fryses ned til senere brug. Prøven skal herefter tilsættes, hvilket er det mest arbejdskrævende trin. Med en rationel tilrettelæggelse af dette trin med multikanal pipetter eller robot vil dette dog være overkommeligt. Da PVY og PLRV assayet er et såkaldt plus/ minus assay vil man kunne indkøbe flere PCR maskiner og dermed køre assayet i parallel for flere plader og derefter måle fluorescens i TaqMan apparatet. Det vurderes at 2000-3000 enkeltprøver kan køres dagligt.

### **Samlet vurdering af metoden:**

TaqMan metoden var ikke så følsom som den ELISA metode der i dag anvendes ved vinterafprøvningen. Det er vores vurdering at følsomheden i TaqMan metoden kan forbedres markant ved anvendelse af en mere effektiv prøveforberedelses-teknik. Vi finder derfor, at metoden har potentiale til massetestning af kartoffelknolde, dog kræves en mere rationel og effektiv metode til ekstraktion af RNA fra knolde. Der findes i dag maskiner på markedet til dette.

Til slut skal det nævnes, at metoden kræver en vis påpasselighed for ikke at forurene sunde prøver med inficeret materiale og dermed få falske positive. Personale bør specifikt oplæres i at opsætte disse assays og særlig i at undgå forureninger.

### **Afvielser fra den oprindelige projektplan.**

Ved en nærmere undersøgelse af de tilgængelige metoder fandtes det, som nævnt tidligere, at TaqMan metoderne til PVY og PLRV ikke var optimale. Da vi fandt det u hensigtsmæssigt at teste en metode der ikke virker optimalt besluttedes det at ofre ressourcer på at udvikle en bedre metode. Desuden blev der lavet undersøgelser med henblik på at reducere arbejds- og driftomkostninger ved assayet (lavere volumen, nedfrysning af plader).

Der blev testet et stort antal knolde ved vinterafprøvningen, desværre vidste vi ikke hvilke knolde der var inficerede men kun den procentuelle infektion. Derfor blev det besluttet at teste færre knolde end lovet i ansøgningen og så til gengæld undersøge de TaqMan testede knolde ved den traditionelle metode (fremspiring og ELISA) og sammenholde disse data.

Der blev ikke fundet PLRV (i nævneværdig grad) i vinterafprøvningen. Derfor har vi ikke kunnet undersøge den udviklede metode på et stort antal knolde for PLRV. Vi har dog testet metoden på få inficerede knolde vi havde i forvejen.

## **Appendiks A:**

### **Arbejdsgang ved TaqMan metoden**

#### **RNA ekstraheres fra kartoffelknolde**

Der findes et stort antal metoder til isolering af RNA fra planter. Groft kan man sige, at der findes a) billige men arbejdskrævende og b) dyre og hurtige metoder. Denne arbejdsgang vurderes i alle tilfælde at være den mest arbejdskrævende metode samt den der er sværest at rationalisere.

#### **TaqMan assay**

Der forberedes en 'plade' med plads til 96 eller 384 prøver. Der pipetteres omkring 5-15  $\mu$ l reagens mix i hver 'brønd' og derefter tilsættes 1  $\mu$ l prøve (der findes robotter til dette arbejde). Pladen sættes til amplifikation hvorved et fluorescerende signal dannes i de prøver hvor der er virus til stede. Dette tager ca. 2 timer. Resultatet bliver løbende lagret i PC og disse kan analyseres i f.eks. EXCEL.

## Appendiks B.

Resultater af sammenligning af ELISA og TaqMan resultater. Testene er udført på de samme knolde (f.eks. er 'Lyra 1' knold 1 fra partiet med Lyra knolde). + betyder svagt signal; +++ betyder kraftigt signal.

Tuber	ELISA	ELISA value	TaqMan
Lyra 1	nd	nd	++
Lyra 2	+++	3.456	++
Lyra 3	(+)	0.215	-
Lyra 4	+++	2.699	++
Lyra 5	+++	3.499	++
Lyra 6	+++	2.793	+
Lyra 7	(+)	0.114	-
Lyra 8	-	0.053	-
Lyra 9	+++	3.136	++
Lyra 10	nd	nd	-
Lyra 11	+++	2.600	-
Lyra 12	+++	3.040	+
Lyra 13	nd	nd	-
Lyra 14	nd	nd	+
Lyra 15	+++	3.436	++
Lyra 16	+++	3.128	+
Lyra 17	+++	3.416	-
Lyra 18	nd	nd	-
Lyra 19	+++	3.386	++
Lyra 20	nd	nd	+
Ditta 21	(+)	0.119	-
Ditta 22	+++	3.032	++
Ditta 23	+++	3.540	-
Ditta 24	+++	2.975	+
Ditta 25	-	0.096	-
Ditta 26	+++	2.586	+++
Ditta 27	+++	3.350	++
Ditta 28	+++	3.200	+++
Ditta 29	+++	2.959	+++
Ditta 30	+++	2.851	+++
Ditta 31	+++	3.074	++
Ditta 32	nd	nd	+
Ditta 33	+++	3.100	-
Ditta 34	nd	nd	+++
Ditta 35	-	0.047	+
Ditta 36	+++	3.017	+
Ditta 37	+++	3.750	++
Ditta 38	+++	3.331	+++
Ditta 39	nd	nd	-
Ditta 40	-	0.078	+
Nicola 41	nd	nd	+
Nicola 42	(+)	0.199	+
Nicola 43	+++	3.746	-
Nicola 44	+++	3.158	-
Nicola 45	+++	3.358	++
Nicola 46	(+)	0.265	-
Nicola 47	-	0.098	-
Nicola 48	(+)	0.130	-
Nicola 49	(+)	0.231	-
Nicola 50	(+)	0.133	-

Nicola 51	-	0.066	-
Nicola 52	-	0.094	-
Nicola 53	nd	nd	-
Nicola 54	+++	3.286	+
Nicola 55	+++	3.536	++
Nicola 56	(+)	0.199	-
Nicola 57	nd	nd	-
Nicola 58	nd	nd	-
Nicola 59	nd	nd	-
Nicola 60	(+)	0.170	-
Spunta 61	-	0.037	-
Spunta 62	+++	3.279	-
Spunta 63	nd	nd	-
Spunta 64	-	0.040	-
Spunta 65	-	0.076	-
Spunta 66	+++	3.406	+++
Spunta 67	+++	3.586	+++
Spunta 68	-	0.063	(+)
Spunta 69	+++	3.297	+
Spunta 70	-	0.060	(+)
Spunta 71	(+)	0.142	(+)
Spunta 72	-	0.080	-
Spunta 73	-	0.052	-
Spunta 74	-	0.020	-
Spunta 75	-	0.028	-
Spunta 76	-	0.021	-
Spunta 77	-	0.088	-
Spunta 78	(+)	0.149	-
Spunta 79	-	0.059	-
Spunta 80	nd	nd	-
Bintje 81	-	0.098	-
Bintje 82	-	0.055	-
Bintje 83	(+)	0.182	-
Bintje 84	(+)	0.139	-
Bintje 85	(+)	0.270	-
Bintje 86	(+)	0.127	-
Bintje 87	(+)	0.163	-
Bintje 88	++	0.427	-
Bintje 89	-	0.067	-
Bintje 90	++	0.573	-
Bintje 91	++	1.328	-
Bintje 92	(+)	0.222	-
Bintje 93	(+)	0.172	-
Bintje 94	nd	nd	-
Bintje 95	-	0.088	-
Bintje 96	nd	nd	-
Bintje 97	++	0.385	-
Bintje 98	++	1.034	-
Bintje 99	-	0.041	-
Bintje 100	++	0.563	-