

XXXII. OTDK Biológia Szekció

RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása az alma vírusfertőzöttségének kimutatására

Készítette: Varga Tünde

Biológus MSc, 1. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,

NAIK - Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Témavezető: Dr. Várallyay Éva

tudományos főmunkatárs, NAIK-MBK

2015



Tartalom

I. Bevezetés és célkitűzések	3
II. Anyag és módszer.....	5
1. Növényi minták.....	5
2. RNS kivonás	5
3. cDNS szintézise reverz transzkripcióval.....	6
4. Primer tervezés <i>Malus domestica</i> aktin mRNS-re	7
5. cDNS minőségének ellenőrzése (Aktin teszt).....	7
6. Primer tervezés a négy alma karantén vírusra	8
7. Az almavírus primerek anellálásához megfelelő hőmérséklet megkeresése - Gradiens PCR	8
a) Alma RT Pool készítés:.....	8
b) PCR-Gradiens 45-65°C:.....	9
8. Diagnosztikai PCR reakció a 4 alma vírusra	9
9. Vírusdiagnosztika alma mintákon duplex-PCR-rel	10
10. PCR termékek tisztítása, szekvenálása, a keresett vírusok szekvenciáinak visszaigazolása.....	10
11. Az izolátorházas- és szabadföldi fajtajelölt mintákban talált vírustörzsek szekvenciáinak összehasonlítása	11
III. Eredmények és értékelésük.....	12
1. RNS kivonás	12
2. RT és az RT során készült cDNS minőség ellenőrzése aktin primerekkel.....	12
3. Vírus primerek tervezése	13
4. Gradiens PCR.....	18
5. PCR-vírus primerek különböző kombinációinak tesztelése	19
6. Vírusdiagnosztika duplex PCR-rel	20
7. A felamplifikált vírustörzsek rokonsági vizsgálata.....	23
IV. Összefoglaló	32
V. Summary.....	33

I. Bevezetés és célkitűzések

A növényvírusok a növényt fertőzve, és megbetegítve a termés minőségbeli és mennyiségbeli romlását eredményezik, így évről évre jelentős gazdasági kárt okoznak. Ezen kórokozók morfológiai, citológiai és hormonális változásokat okoznak a növényekben, melyek különféle külső és belső tünetekben nyilvánulnak meg. Hatásuk lehet a növény növekedésére, fejlődésére, így kihatnak az évelő fásszárúak élethosszára, a termés hozamra, illetve a termés minőségére is.

Gazdaságilag fontos növényeink folyamatosan ki vannak téve ezen kórokozók támadásának. A helyzetet súlyosbítja, hogy a globális kereskedelemmel a vírusok szinte bárhová eljuthatnak gazdanövényeikkel. Mivel a növényvédő szerek nem alkalmasak a fertőzött növények vírusmentesítésére, így a fertőzés megelőzésével érdemes és kell foglalkozni. Ilyen módszerek a rezisztenciára nemesítés, a vírusvektorok elpusztítása, vagy a vírusmentes szaporítóanyagok használata (Horváth és Gáborjányi, 1999). Az almafák szaporítása a fajtafenntartás érdekében vegetatívan történik, így a vírusok már magával a szaporítóanyaggal könnyen átjutnak az új növényekbe. Ez a probléma különös jelentőséggel bír az alma, mint évelő, fásszárú növény esetén, mivel az alma ültetvények egészségének megőrzése, vírusmentes fenntartása akár évtizedekig is fontos lehet.

Magyarországon az új gyümölcsfafajták nemesítésekor az anyanövényeket kötelező bizonyos vírusokra szűrni. Almafák esetében ezek az alma klorotikus levélfoltosság (Salmon, 2007) (Apple chlorotic leaf spot virus - ACLSV), az alma mozaik vírus (Apple mosaic virus - APMV), az almafa törzsbarázdáltság vírus (Apple stem-grooving virus - ASGV) és az almafa törzsgödrösödés vírus (Apple stem-pitting virus - ASPV). Ha az anyató ezen vírusok valamelyikével fertőzött, akkor vírusmentesíteni kell, ami általában a merisztéma, vagy hajtáscsúcs *in vitro* szaporítását jelenti. Mivel a vírusok legtöbbje a merisztémába nem tud belepni, így az ebből nevelt *in vitro* növények is vírusmentesek lesznek. Az ilyen elsődleges tenyészetekből többlépcsős regenerációval lehet a vírusmentes anyanövényt felnevelni. A vírusmentes kiinduló állományból hozzák létre később a vírusmentes törzsállományt (prebázist), majd a vírusmentes törzsültetvényeket (bázist). A fajtanemesítés folyamatának minden szintjén ELISA teszt alapján szelektálják ki a fertőzött növényeket. Mivel már a nemesítés is hosszú évekig tart, fontos hogy a szintén sokáig tartó vírusmentesítési folyamat alatt, és később is minél hatékonyabb legyen a fajtajelölt törzsültetvényeken alkalmazott, vírusok szűrésére használt diagnosztikai eljárás (Horváth és Gáborjányi, 1999).

A vírusok detektálására a kötelező hatósági szűrések során főként ELISA tesztek alkalmaznak, melyek a vírus köpenyfehérjét felismerő specifikus ellenanyagon alapuló módszerek. Mivel a köpenyfehérje könnyen mutálódik és ilyenkor a tesztek már nem képesek kimutatni a keresett vírust, érdemes érzékenyebb eljárást alkalmazni. ELISA tesztek főként rutin ellenőrzésekhez érdemes használni, illetve amikor a fertőzött növényben magas koncentrációban van jelen a vírus, de mind a mono- mind a poliklonális ellenanyaggal való reakciók során gyakran lépnek fel problémák (Berniak és mtsai., 2009). A fent felsorolt négy kórokozó RNS vírus, melyekben az RNS-ek mennyisége nagyobb, mint a fehérjéé, illetve a vírus RNS-ek tartalmazzak az adott vírusra jellemző konzervatív szakaszokat. Az ilyen ritkán mutálódó konzervatív szakaszokra tervezett specifikus primereket használva a PCR-alapú eljárások az ELISA tesztekénél már hatékonyabbak, ami még hatványozódik azzal, hogy az eljárás során amplifikáció is történik. Összességében az RT-PCR alapú módszerek akár százszor érzékenyebbek lehetnek az ELISA tesztekénél (Berniak és mtsai., 2009). Ezért tehát célszerű a nukleinsav-alapú diagnosztikai módszerek kidolgozásával és fejlesztésével foglalkozni.

Kísérleteim három fő céljaként tűztem ki, hogy:

- 1/ a négy kötelezően szűrendő vírus detektálásához egy az ELISA módszernél hatékonyabb PCR alapú diagnosztikai eljárást fejlesszek ki,
- 2/ az optimalizált módszert alkalmazzam különböző hazai izolátorházban tartott prebázis, valamint szabadföldi termő és fajtajelölt törzsültetvények almafáin,
- 3/ szekvenciájuk alapján összehasonlítsam az izolátorházban tartott prebázisban és a szabadföldi fajtajelölt almafákban talált vírustörzseket.

II. Anyag és módszer

1. Növényi minták

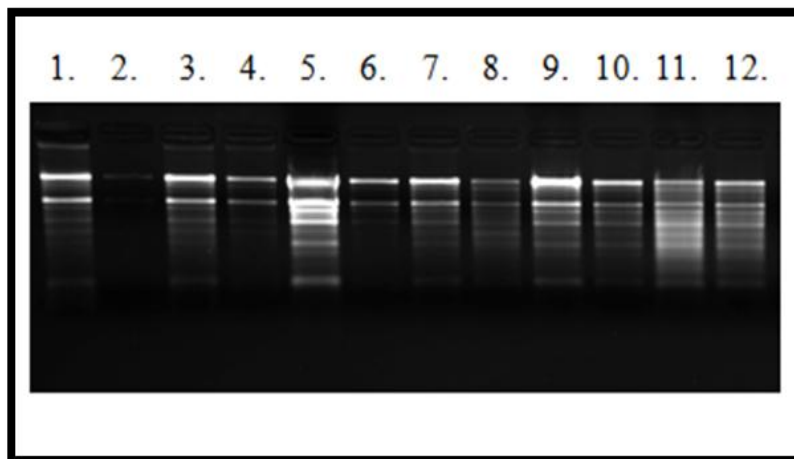
A kísérleteket magyarországi alma mintákon végeztem, melyeket együttműködő partnereink, a Corvinus Egyetem kutatói gyűjtöttek szabadföldi termő és fajtajelölt törzsültetvényekről, illetve izolátorházban nevelt fajtajelöltekről. A vizsgálatba bevontam a 2014-ben Magyarország fája címet nyert 280 éves gödöllői Öreg Vackorfát is, melyről levél és fiatal termés mintát is szedtem. A mintavételtől a felhasználásig -70°C -on tároltam a növényi mintákat.

2. RNS kivonás

A minták teszteléséhez 0,1-0,15 g növényi szövetből tisztítottam RNS-t Gambino és munkatársai protokollja alapján (Gambino és mtsai., 2008). Röviden: dörzsmozsárban homogenizált mintához 17 μl β -mercaptoetanolt és 850 μl 65°C -ra előmelegített extrakciós puffert (EB: $2^{\circ}\text{CTAB} + 2,5\%\text{PVP} + 100\text{mM Tris-HCl} + 25\text{mM EDTA} + 2\text{M NaCl}$) adtam. 10 percre 65°C -os vízfürdőbe raktam, időnként vortexeltem őket. Ezután 850 μl kloroform:isoamilalkohol (24:1)-t adtam hozzá, majd centrifugáltam (13.000 rpm) 4°C -on 10 percet. A centrifugálás után kialakult felülúszót 800 μl kloroform:isoamilalkohol (24:1)-ba mértem, majd ismét centrifugáltam (13.000 rpm) 4°C -on, 10 percig. A felülúszóból 450 μl -t 250 μl 9M LiCl-hoz mértem, 30 percre jégre raktam, majd centrifugáltam (13.000 rpm), 4°C -on, 20 percig. A kialakult csapadékra 450 μl 65°C -ra melegített SSTE-t (SSTE: 1M NaCl + 0,5%SDS + 10mM Tris-HCl + 1mM EDTA) és 450 μl kloroform: isoamilalkoholt mértem, majd lecentrifugáltam (13.000 rpm) 4°C -on, 10 percig. A felülúszóból 400 μl -t rámértem 280 μl izopropanol és 30 μl 4M NaAcetát (pH5,2) keverékére, ezt 4°C -on centrifugáltam (13.000 rpm) 20 percig. Az Eppendorf-csövek alján maradt csapadékot átmostam 1 ml 70% hideg EtOH-al, 4°C -on centrifugáltam (13.000 rpm) 5 percig. Ezután 10 percig szárítottam a mintákat speed vac-ban, majd a visszaoldást 25-25 μl steril milliQ tisztaságú steril vízzel (MQ)-val végeztem el.

Az RNS tisztítás sikerességét a minták 1,2%-os agaróz gélelektroforezissel történő szétválasztásával ellenőriztem. Az egyes minták töménységét és szennyezettségét Nanodrop

készülékben mértem. Egy ültetvényről 6-12 RNS kivonást végeztem. A minőség-ellenőrzés után a megfelelő mintákat összemérve ültetvényt poolt készítettem. Az 1. ábrán a Corvinus Egyetem szabadföldi törzsültetvényéről származó Artemisz fajta RNS tisztításának gélképe látható.



1. ábra

Szabadföldi törzsültetvényekről származó Artemisz almafajta RNS tisztításának eredménye: agaróz gélelektroforezissel szétválasztott és EtBr-dal festett tisztított RNS-ek képe UV fényben.

3. cDNS szintézise reverz transzkripcióval

A vírusok kimutatására szolgáló PCR során a vírus specifikus primerekkel DNS fragmentumokat tudunk felszaporítani, amihez a tisztított RNS-ből cDNS-t kell előbb szintetizálni és csak ezután kezdhető el a kórokozók kimutatása a mintákból.

A reverz transzkripciót a Thermo Scientific Revertaid First strand cDNA synthesis kitjével végeztem a kitleírás alapján. Röviden: 0,25 μ l random primerhez templátként 500 ng tisztított RNS-t adtam, majd MQ-val 3,12 μ l-re egészítettem ki az oldatot és jégre tettem. Gyors centrifugálás után denaturáltam (5 perc, 65°C). Utána jégen hozzáadtam 1,88 μ l-t a következő keverékből: mintánként 1 μ l 5x Reaction buffer + 0,5 μ l 10 mM dNTP + 0,125 μ l Ribolock RNáz inhibitor + 0,25 μ l Revertaid RNS polimeráz enzim. A mintákat 25°C-on, 10 percig anelláltam, 42°C-on 50 percig, majd 45°C-on 10 percig (cDNS szintézis) inkubáltam, végül 70°C-on 5 percig inaktiváltam az enzimet. A cDNS-t a PCR reakciókhoz 10-szeresére hígítottam (2 μ l cc.RT + 18 μ l MQ).

4. Primer tervezés *Malus domestica* aktin mRNS-re

Az irodalomban (Hassan és mtsai., 2006) (Menzel és mtsai., 2002) a vírus-kimutatásra használt protokollokban a cDNS szintézisét egyből követi a vírus specifikus primerekkel való diagnosztikai PCR reakció. Laborunkban e két lépés közé beiktatjuk a cDNS minőségének ellenőrzését szolgáló, általunk „aktin tesztnek” nevezett eljárást. Ehhez szükséges az almára specifikus aktin mRNS-re primereket tervezni.

Az NCBI oldalán megkerestem a *Malus domestica* aktin mRNA szekvenciáját (ID: AB638619.1). 20 bp hosszú, PCR-hez használható sense és antisense primert terveztem úgy, hogy kb. 600 bp-t fogjanak közre. A primertervezéskor figyeltem arra, hogy a 3' vég mindig citozin, vagy guanin legyen és hogy ne legyen sok (> 3db) bázisismétlődés a primerszekvenciában. A két szakasz alkalmasságát PCR Primer Stats programmal ellenőriztem le (hőmérséklet optimum, stb.).

5. cDNS minőségének ellenőrzése (Aktin teszt)

Ahhoz, hogy leellenőrizsem vajon sikeres volt-e a reverz transzkripció és ezzel megfelelő minőségű cDNS-t nyertem-e, alma aktin mRNS-re terveztem specifikus primereket, melyekkel PCR reakciót mértem össze.

Az aktin mRNS darabjának amplifikálásához az alábbi primereket használtam:

Mxdaktin1s: GGAAGTGGGAATGGTGAAGGC;

Mxdaktin719as: GCTCCAATTGTGATGACTTG.

A reakció összemérésekor a Thermo Scientific Phire DNS polimerázát használtam. A teszt során 14,5 µl reakcióelegyhez (1 reakcióra: 9,4 µl MQ + 3,0 µl 5xPhire puffer + 0,75 µl (10 pmol/µl) Mxdaktin1s primer + 0,75 µl (10 pmol/µl) Mxdaktin719as primer + 0,3 µl 10mM dNTP + 0,3 µl Phire enzim) 0,5 µl 10xhíg cDNS-t adtam. Negatív kontrollként cDNS-es helyett MQ vizet használtam templátként. A PCR reakció során először 98°C-on 30 másodpercig denaturáltam a DNS-t. Ezt követte 35 ciklusban a denaturálás 10 másodpercig 98°C-on, az anellálás 10 másodpercig 55°C-on és az elongáció 20 másodpercig 72°C-on. Végül 1 percig 72°C-on láncépítéssel zárult a reakció. A kapott PCR termékeket 1,2%-os agaróz gélen gélelektroforezissal ellenőriztem.

6. Primer tervezés a négy alma karantén vírusra

Az irodalomban használt primerek szekvenciáit (Hassan és mtsai., 2006) (Menzel és mtsai., 2002) a CLUSTALW programot használva összehasonlítottam az NCBI oldalán található vírusszekvenciákkal. Mivel ezek a primerek nem tűntek minden esetben elég specifikusnak, újabbakat terveztem, az aktin primer tervezésénél leírt módon. A vírus primertervezéskor igyekeztem minél több vírus variáns szekvenciát bevonni a tervezésbe, hogy azok minél reprezentatívabban mutassák a különböző vírusvariánsok szekvenciájában mutatkozó diverzitást. Arra is figyeltem, hogy primereim és a templátok között ne, ill. a lehető legkevesebb mismatch legyen (Malinowski, 2005). Ezeken kívül specifikus vírusprimereim tervezésekor az aktin primer tervezésénél már leírt szempontokat szintén figyelembe vettem. A primertervezéshez az ACLSV esetében 14, az APMV esetében 13 az ASPV és az ASGV esetében 6 Genbank-ben található vírus szekvencia illesztését vettem figyelembe. A négy vírusra tervezett primerek szekvenciái:

Aclsv6853s: AGACCCCTTCATGGAAAGACAGG;

Aclsv7525as: CTATTTATTATAAGTCTAAACACT

Apmv1295s: CCGTGAGGAGGACAGCTTGG

Apmv1779as: CAGATCTTCATCGATAAGTAGAAC

Aspv1169s: CTGGAACCTCATGCTGCAAACCTC

Aspv1553as: CACACATAGCCGCCCCNGTTAGG

Asgv6021s: GAATTGAAAACCTTTGCTGCCAC

Asgv6358as: GACTYCTAACCCTCCAGTTCCAG

7. Az almavírus primerek anellálásához megfelelő hőmérséklet megkeresése - Gradiens PCR

a) Alma RT Pool készítés: Munkánk kezdetén nem kaptunk az adott vírusra biztosan pozitív mintát. Feltételeztem azonban, hogy a kapott levélminták közt megtalálható a négy karantén vírus mindegyike, így a különböző ültetvényekről szedett 10 db alma cDNS (10xhíg RT) mindegyikéből 3 μ l-t összemértem, így összesen 30 μ l 10xhíg Alma RT-Pool-t kaptam. PCR során meggyőződtem róla, hogy a poolból valóban felamplifikálható a vizsgálni kívánt vírusok mindegyike, tehát a következő lépéshez ezt használtam templátként.

b) PCR-Gradiens 45-65°C: A PCR-t beállítottam úgy, hogy egymás melletti oszlopai 6 különböző hőmérsékleten végezzék az anellálást, így egy sort tekintve balról jobbra emelkedő hőmérséklet gradienst értem el. A sorokat felosztottam a vizsgált vírusok között, így az 1. sorban Apmv primereket, a 2. sorban Aspv primereket, a 3. sorban Aclsv primereket, míg a 4. sorban Asgv primereket használtam. Minden sorban a 6 különböző hőmérsékletre teszteltem a primereket (1.táblázat), melyek közül az egyikhez MQ-t adtam templátként, hogy ez legyen a negatív kontroll. A gradiens PCR során nyert termékeket gélelektroforezissel ellenőriztem 1,2%-os agaróz gélen.

	45,5 °C	50,5 °C	53,4 °C	56,6 °C	61,8 °C	64,6 °C
1.Sor: APMV	Apmv x pool	Apmv x pool	Apmv x MQ	Apmv x pool	Apmv x pool	Apmv x pool
2.Sor: ASPV	Aspv x pool	Aspv x pool	Aspv x MQ	Aspv x pool	Aspv x pool	Aspv x pool
3.Sor: ACLSV	Aclsv x pool	Aclsv x pool	Aclsv x MQ	Aclsv x pool	Aclsv x pool	Aclsv x pool
4.Sor: ASGV	Asgv x pool	Asgv x pool	Asgv x MQ	Asgv x pool	Asgv x pool	Asgv x pool

1. táblázat

A gradiens PCR során a PCR készülék különböző pozícióiban összemért vírusspecifikus primerek és az annellálás hőmérsékletek elhelyezkedése.

8. Diagnosztikai PCR reakció a 4 alma vírusra

Az eljárás során a Thermo Scientific Phire Green Hot Start II DNS polimerázát használtam. Az egyedi PCR során 9,4 μ l MQ-t, 3,0 μ l 5xPhire Green Reaction Buffert, 0,75 μ l (10 pmol/ μ l) vírus sense primert, 0,75 μ l (10 pmol/ μ l) vírus antisense primert, 0,3 μ l 10mM dNTP-t, 0,3 μ l Phire Hot Start II DNA Polymerase enzimet és 0,5 μ l 10xhíg cDNS templátot mértem össze. A PCR kezdeti lépéseként elődenaturáltam a cDNS-t (98°C-on 30 msp.). Ezt 35 ciklusban követte a denaturáció (98°C-on 10 msp.), az anellálás (55°C-on 10 msp.), majd az elongáció (72°C-on 20 msp.). A végső lépés, a láncépítés (72°C 1 perc) volt. Az amplifikált termékeket agaróz gélen (1,2%) futtatva ellenőriztem.

Multiplex-PCR-ként az általam kipróbált kombinációk a következők voltak:

duplex: Aclsv(672bp) x Aspv(384bp);
Apmv(487bp) x Asgv(337bp);
Aspv(384bp) x Asgv(337bp),
triplex: Aclsv(672bp) x Apmv(487bp) x Aspv(384bp),
tetraplex: Aclsv(672bp) x Apmv(487bp) x Aspv(384bp) x Asgv(337bp).

9. Vírusdiagnosztika alma mintákon duplex-PCR-rel

Mivel a kombinációk közül a duplexek jól alkalmazhatónak tűntek, a továbbiakban ezt az összeállítást használtam a különböző magyar ültetvényekről származó minták tesztelésére.

10. PCR termékek tisztítása, szekvenálása, a keresett vírusok szekvenciáinak visszaigazolása

A PCR során keletkezett termékek bázissorrendjét meghatároztattam, hogy igazoljam: a vírusok kimutatására tervezett specifikus primereim valóban a keresett vírusokat szaporították fel.

Szekvenálás előtt a DNS mintáimat a Geneaid PCR DNA Fragments Extraction Kit használatával (a PCR Clean Up Protocol kitleírás alapján) tisztítottam meg a mintákban maradt enzimtől és be nem épült nukleotidoktól. Röviden: 47 μ l PCR termékhez 250 μ l DF puffert adtam. Ezt az elegyet DF oszlopba pipettáztam át, majd lecentrifugáltam (30 msp., 14.000 rpm). Az átfolyó leöntését követően 600 μ l Wash puffert mértem a DF oszlop közepére és egy perces állás után 30 msp-ig 14.000 rpm-en centrifugáltam. Az átfolyót ismét leöntöttem, majd centrifugában szárítottam az oszlopot (3 perc, 14.000 rpm). A DF oszlopra 25 μ l Elúciós puffert pipettáztam, ezt 2 percig hagytam állni, majd 2 percig centrifugáltam 14.000 rpm-en. A tisztított DNS terméket 1,2%-os agaróz gélen futtatva ellenőriztem, majd BIOMI Kft-vel meghatároztattam a bázissorrendjét.

Az eredményül kapott bázissorrendet a Clustal Omega oldalának segítségével hasonlítottam össze a specifikus vírusprimerek tervezéskor már használt vírusszekvenciákkal (2. ábra).

D14995.2	TAACACCTGATGAGAAACAGGTGATTGATAGAATGACCAAAGACTTTTCGTACTGAAG
JN701424.1	TAACACCTGATGAAAACAGGTGATTGATAGGATGACCAAGAGGCTTTTCGCACTGAAG
JQ308181.1	TAACACCTGATGAAAACAGGTGATTGATAGGATGACCAAAGGCTTTTCGTACTGAAG
AB004063.1	TAACACCTGATGAGAAACAGGTGATCGACAGGATGACCAAAGGCTTTTCGTACTGAAG
2.Asgv_10-14#Asgv	TAACGCCTGATGAAAACAGGTAATAGACAGAATGACTAAGAGGCTTTTCGTACTGAAG
1.Asgv_4-5#Asgv	TAACGCCTGATGAAAACAGGTAATAGACAGAATGACTAAGAGGCTTTTCGTACTGAAG
JX080201.1	TAACGCCTGATGAAAACAGGTAATAGACAGAATGACTAAGAGGCTTTTCGTACTGAAG
HE978837.1	TAACGCCTGATGAAAACAGGTAATAGACAGAATGACTAAGAGGCTTTTCGTACTGAAG
	**** * * * * *

2. ábra

PCR technikával felamplifikált Asgv vírusszekvenciák (szürkével kiemelve) összehasonlítása hat, az NCBI szekvenia adatbázisban talált Asgv törzs bázissorrendjével (részlet).

Az összehasonlítás során mindig volt a vírustörzsek szekvenciái között pár bázispárnyi különbség - aminek oka a vírusok gyors adaptációja, de az eredmény mindig azt mutatta, hogy a PCR reakció által felsokszorozott DNS termék valóban a keresett vírusból való.

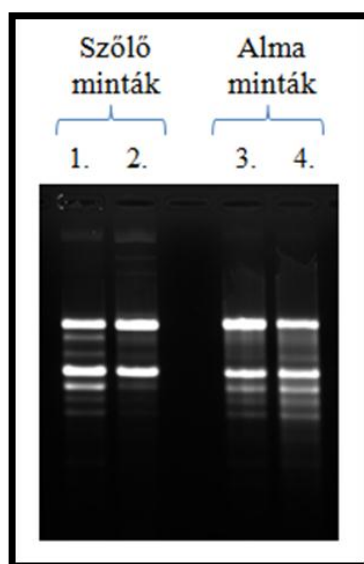
11. Az izolátorházas- és szabadföldi fajtajelölt mintákban talált vírustörzsek szekvenciáinak összehasonlítása

Az izolátorházas- és szabadföldi fajtajelölt almamintákon elvégzett PCR eljárás után a felamplifikált vírusfragmentumok szekvenciáit ClustalOmega illesztőprogram segítségével hasonlítottam össze. Illesztéskor a program filogenetikai fát is készít, mely alapján a törzsek rokonsági viszonyai demonstrálhatók. Ezek alapján szerettem volna megtalálni a választ arra a kérdésre, hogy vajon a szabadföldi fajtajelöltek kiültetés után fertőződtek a vírusokkal, vagy már az izolátorházban is vírusosak voltak és esetleg a vírusmentesítési folyamat nem volt tökéletes?

III. Eredmények és értékelésük

1. RNS kivonás

Laborunk a szőlővírusok diagnosztikájával foglalkozik; az RNS kivonási eljáráshoz Gambino és munkatársai által kifejlesztett protokollt alkalmazza (Gambino és mtsai., 2008) szőlőre optimalizálva. Ezt a módosított protokollt használtam saját alma mintáim RNS tisztításakor is – és ahogy az ábrán is látható, hasonlóan jól működik akár alma, akár szőlő mintán (3. ábra). Az RNS tisztítási módszerünkkel, 0,1-0,15 g növényi szövetből kapott kivonat a szövet minőségétől függően általában 250-500 ng/ μ l RNS-t tartalmazott.

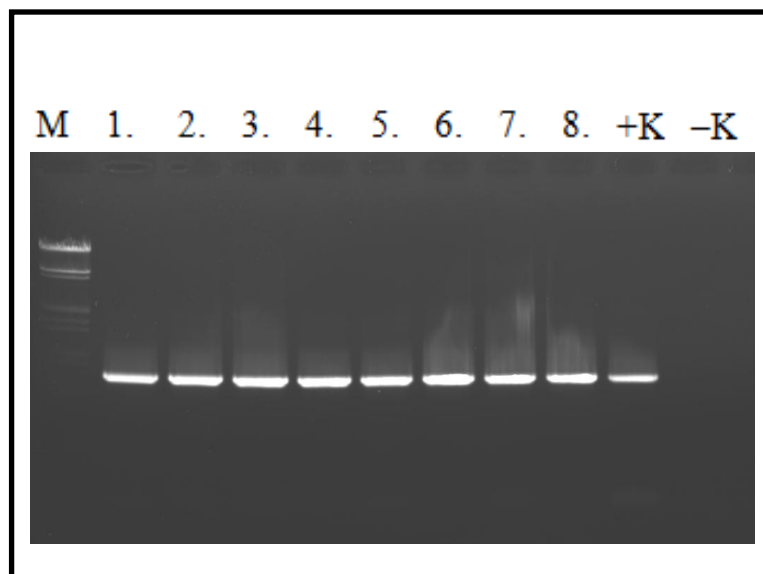


3. ábra

A laborunk által optimalizált Gambino és munkatársai által kidolgozott RNS kivonási protokollal tisztított szőlő és alma minták gélelektroforetikus képe 1,2% agaróz gélen történő szétválasztás után.

2. RT és az RT során készült cDNS minőség ellenőrzése aktin primerekkel

Ahhoz, hogy az almaminták örökítőanyagából szekvencia specifikusan sokszorozhassam a vizsgálni kívánt vírusokat, vagy endogén RNS-eket, cDNS-t kellett készítenem róluk. A cDNS minőségét az általam tervezett alma aktin mRNS-re specifikus primerekkel összemért PCR reakcióval ellenőriztem (4. ábra).



4. ábra

Alma minták cDNS szintézisének minőségellenőrzése aktin primerekkel.

M: mólsúly marker, +K: jó cDNS templát, -K: MQ

Az aktin teszt igazolta, hogy az általunk cDNS szintézisre használt kit jól működik és a keletkezett cDNS minősége a további munkának megfelel.

3. Vírus primerek tervezése

Mivel a vírusok gyorsan adaptálódnak a környezeti változásokhoz, összevettem az irodalomban használt (Hassan és mtsai., 2006) (Menzel és mtsai., 2002) primerek szekvenciáit az NCBI oldalán található vírusszekvenciákkal. Ebből kirajzolódott, hogy érdemes lenne újabb, specifikusabb primereket tervezni.

Az 5. ábrán látható a 6db ASPV szekvencia illesztésének részlete, jelölve rajtuk az általam tervezett és az irodalomban közölt PCR primereket. Jól látható, hogy az irodalomban használt vírusprimer nem illeszkedik elég jól, és hogy annak 3'vége adenzin. Ezen kívül előfordultak hosszabb bázisismétlődések is, például a Menzel és munkatársai által használt Asgv antisense primer esetében: „AACCCTTTTGTCTTCAGTACGAA” (Menzel és mtsai., 2002). Ezeket a hibákat szerettem volna saját primereimben kiküszöbölni.

Apple mosaic virus, Referencia: FN435316.1
Oligo tervezés

sárga: Mensel et. al. 2002 cikk
saját

Sense:

apmv1295s:CCGTGAGGAGGACAGCTTGG

```

HG328285.1      AITCCCGTGAGGGTATTTAAT-----AGTCCATCCGTGAGGAGGACGCTTGGGA
HG328282.1      AATCCCGTGAAGGGATTTAAT-----GGTCCGTCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
HG328283.1      AATCCCGTGAAGGGATTTAAT-----AGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
HG328284.1      AATCCCGTGAAGGGATTTAAT-----AGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
AM490197.2      ACTCTCGTGAAGGGA-----GGTCCATCCGTGAGGAGGACGCTTGGGA
FN547927.1      AACCCCATGAGGGGTTATCCCGTGAAGGAA--GGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
FN435316.1      AACTCCGTGAGGGGTTATCCCGTGAAGGAA--GGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
HG328281.1      AACTCCGTGAGGGGTTATCCCGTGAAGGAA--GGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
HG328280.1      AACTCCGTGAGGGGTTATCCCGTGAAGGAA--GGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
HG328270.1      AACACCGTGAGGGGTTATCCCGTGAAGGAA--GGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
HG328264.1      AACTCCGTGAGGGGTTATCCCGTGAAGGAA--GGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
U15608.1        ATCCCGGTGAGTGATC--CCGTGCAGGGAGGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
L03726.1        ATCCCGGTGAGTT-ATC--CCGTGCAGGGAGGTCCATCCGTGAGGAGGACAGCTTGGGA
*      *.***.   :      .  *  * :*****.*****

```

Antisense:

apmv1779as: CAGATCTTCATCGATAAGTAGAAC

GTCTACTTATCGATGAAGATCTG reverz komplementere: CAGATCTTCATCGATAAGTAGAAC

```

HG328285.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
HG328282.1      CGAATTTCCGCTGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
HG328283.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
HG328284.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
AM490197.2      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
FN547927.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
FN435316.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
HG328281.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
HG328280.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
HG328270.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
HG328264.1      CGAATTTGCCGCTGGTGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
U15608.1        CGAATTTGCCGCTGGAGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
L03726.1        CGAATTTGCCGCTGGAGCGAAAGTCTTTATGAGGGATTTGTACGTGATAACGAGTGAGT
*****  ****  *****.*****.*****.*****  ****

HG328285.1      TACCACCTGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
HG328282.1      TACCACCTGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
HG328283.1      TACCACCTGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
HG328284.1      TACCACCTGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
AM490197.2      TACCACCTGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
FN547927.1      TACCACCGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
FN435316.1      TACCACCGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
HG328281.1      TACCACCGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
HG328280.1      TACCACCGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
HG328270.1      TACCACCGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
HG328264.1      TACCACCGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
U15608.1        TACCACCGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
L03726.1        TACCACCGTGCAAATACCGTCGAATGTTCTACTTATCGATGAAGATCTGTTAGATTAT
*****  **.*.***.***.: *. * *****  *****  **.*.*** *****:*. *

```

7. ábra

Az NCBI adatbázisban található 13 APMV vírus szekvenciájának illesztése CLUSTALW programmal (részlet), jelölve az irodalomban használt és az általam tervezett primereket.

Apple stem grooving virus, Referencia:AB004063
Oligo tervezés

Sense:

asgv6021s: GAATTGAAAACCTTTGCTGCCAC

JX080201.1	CGACCTGTCAAAATGTTGTACCCGAATTGAAAACCTTTTCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC
HE978837.1	CGACCTGTCAAAATGTTGTACCCGAATTGAAAACCTTTTCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC
AB004063.1	CGACTTGTCAAAATGTTGTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC
D14995.2	CGATTTGTCAAAATGTTGTTCCCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC
JN701424.1	CGACTTGTCAAAATGTCGTGCTTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC
JQ308181.1	CGACTTGTCAAAATGTCGTACCTGAATTGAAAACCTTTGCTGCCACTTCCAGGCAGAACTC
	*** ***** ** ** ***** ***** *****

JX080201.1	TTTGAACGAATGTACGTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTTGCTGATTTGGCTCGGGAATT
HE978837.1	TTTGAACGAATGTACGTTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTTGCTGATTTGGCTCGGGAATT
AB004063.1	TTTGAATGAATGTACATTCAGAAAGCTTTGTGAGCCATTCGCTGATTTGGCCGTGAGTT
D14995.2	TTTGAACGAATGTACGTTCAGAAAGCTTTGCGAGCCATTTGCCGATTTGGCTCGAGAATT
JN701424.1	TTTGAACGAATGTACGTTCAGGAAGCTTTGTGAGCCATTTGCTGACTTTGGCTCGTGAATT
JQ308181.1	TTTGAACGAATGTACGTTCAGGAAGCTTTGTGAGCCATTTGCCGACTTTGGCTCGCGAATT
	***** ***** ,***** ,***** ***** ** ** ***** ** ** ,**

Antisense:

asgv6358as: GACTYCTAACCCCTCCAGTTCAG

CTGGAACCTGGAGGGTTAGAGTC reverz komplementere: GACTYCTAACCCCTCCAGTTCAG

JX080201.1	AACGCCTGATGAAAAACAGGTAAATAGACAGAACTAAGAGGCTTTTTCGTACTGAAGG
HE978837.1	AACGCCTGATGAAAAACAGGTAAATAGACAGAACTAAGAGGCTTTTTCGTACTGAAGG
AB004063.1	AACACCTGATGAGAAACAGGTGATCGACAGGATGACCAAAAGGCTTTTCGTACTGAAGG
D14995.2	AACACCTGATGAGAAACAGGTGATTGATAGATGACCAAAAGACTTTTTCGTACTGAAGG
JN701424.1	AACACCTGATGAAAAAGCAGGTGATTGATAGGATGACCAAGAGGCTTTTCGCACTGAAGG
JQ308181.1	AACACCTGATGAAAAACAGGTGATTGATAGGATGACCAAAAGGCTTTTTCGTACTGAAGG
	*** ,***** ,** ,***** ,** ** ** ,***** ** ,** ,***** *****

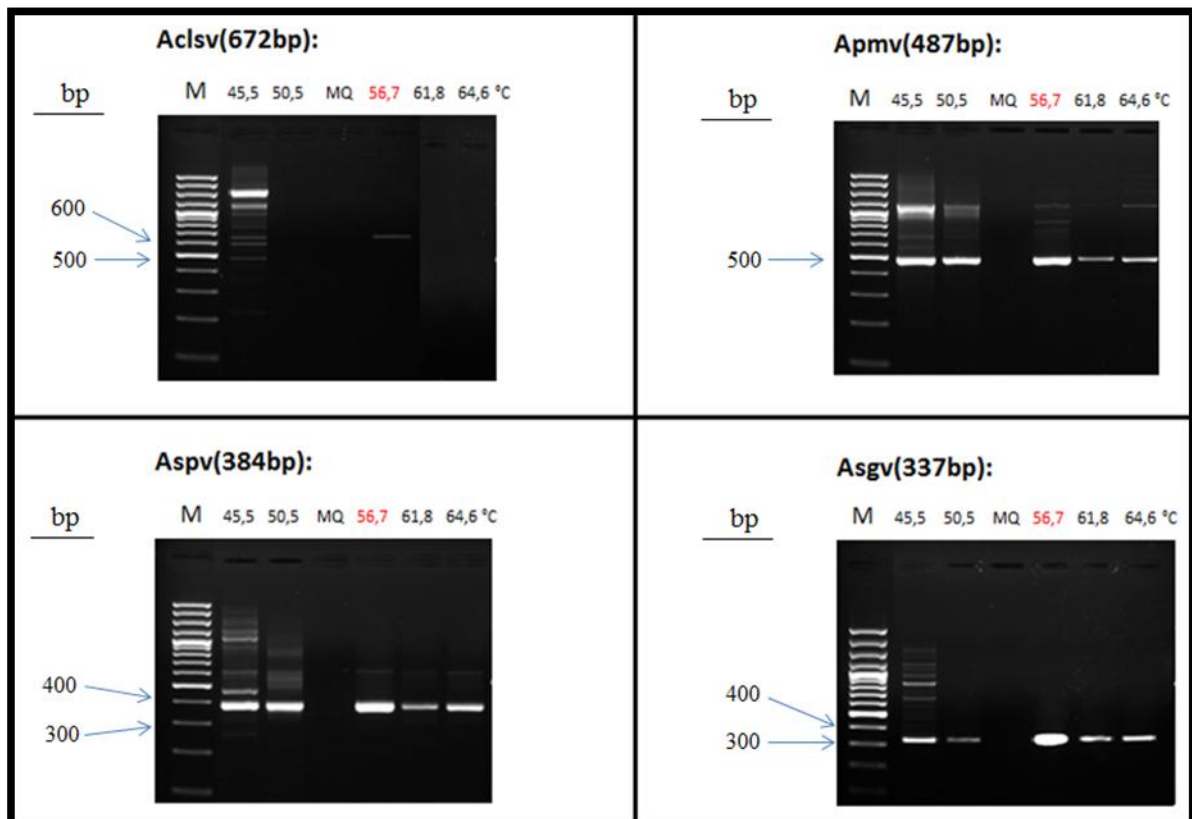
JX080201.1	ACAAAAGGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGCAATCTGGAACCTGGAGGGTTAGAGTC
HE978837.1	ACAAAAGGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGCAATCTGGAACCTGGAGGGTTAGAGTC
AB004063.1	ACAAAAGGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGTAATCTGGAACCTGGAGGGTTAGGAGTC
D14995.2	ACAAAAGGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAAGTAACCTGGAACCTGGAGGGTTAGGAGTC
JN701424.1	ACAAAAGGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCGGAGAGTAATCTGGAACCTGGAGGGTTAGGAGTC
JQ308181.1	ACAAAAGGGGGTTTTCGAGGCGGGTTCAGAGAGTAATCTGGAACCTGGAGGGTTAGAGTC
	***** ,***** ,***** ,** ,** ** ***** ,***** ,*****

8. ábra

Az NCBI adatbázisban található 6 ASGV vírus szekvenciájának illesztése CLUSTALW programmal (részlet), jelölve az irodalomban használt és az általam tervezett primereket.

4. Gradiens PCR

Az újonnan tervezett almavírus primerek anellálásához megfelelő hőmérsékletet gradiens PCR-el választottam ki. A PCR eredményét gélelektroforezissel 1,2%-os agaróz gélen ellenőriztem. A reakció összeméréséhez használt MQ víz a negatív kontrollban tisztának bizonyult, így a mérések megbízhatóak. Mindegyik vírus specifikus primerpár esetében az 56,7°C-ra beállított oszlopban működtek legjobban a primerek, ezért a további kísérleteimhez kiválasztott anellálási hőmérséklet 56°C lett. Az alábbi gélképeken (9. ábra) megfigyelhető, hogy az Aclsv primerek csak gyengén hozzák fel a kívánt fragmentet és hogy az Apmv primerek egyéb, nagyobb méretű DNS részeket is felamplifikálnak - de ezek nem zavarják számottevően a diagnosztikát.

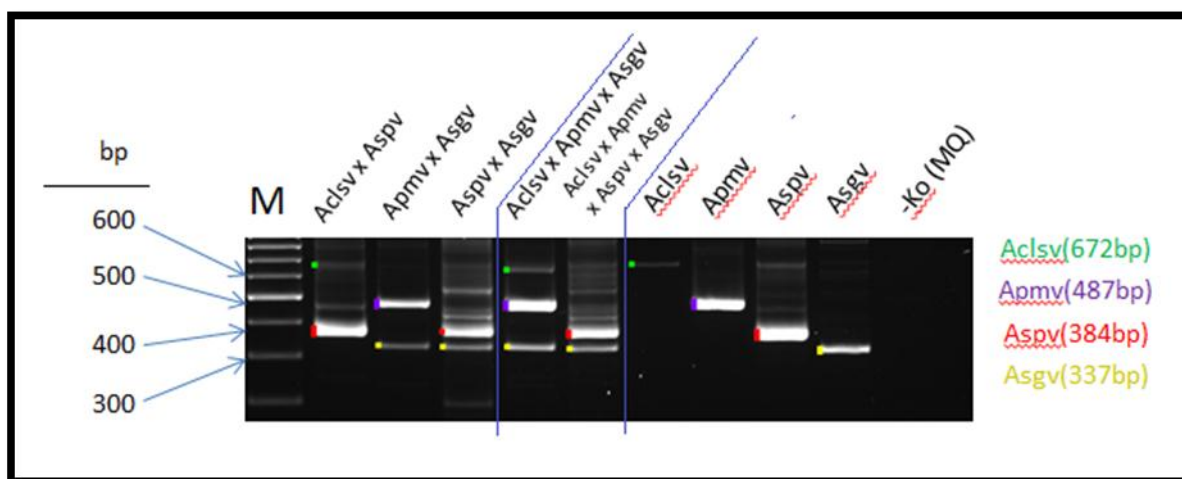


9. ábra

A vírusprimerek anellálásához megfelelő hőmérséklet megkeresése: a Gradiens PCR termékeinek elválasztása agaróz gélen.

5. PCR-vírus primerek különböző kombinációinak tesztelése

Mivel a diagnosztikai módszerek esetében sok minta szűrését kell elvégezni, érdemes a PCR reakciókat több vírusra egyszerre végezni, duplex, vagy multiplex módon. Ilyenkor figyelni kell arra, hogy a primerek kitapadhatnak az alma endogén mRNS-eire, így nem a vírus adott darabja, hanem az alma RNS-ek egy fragmentje amplifikálódik fel. Minél több primert használunk egy multiplex PCR reakcióban, annál jobban nő a lehetősége, hogy melléktermékeink fognak keletkezni. A gradiens PCR-rel optimalizált hőmérsékleten így a vírus specifikus primerpárokat multiplex-PCR-ként is kipróbáltam különböző kombinációkban és egyedi PCR során is. Ezen reakciók termékeit 1,2%-os agaróz gélen választottam el gélelektroforezissel (10. ábra).



10. ábra

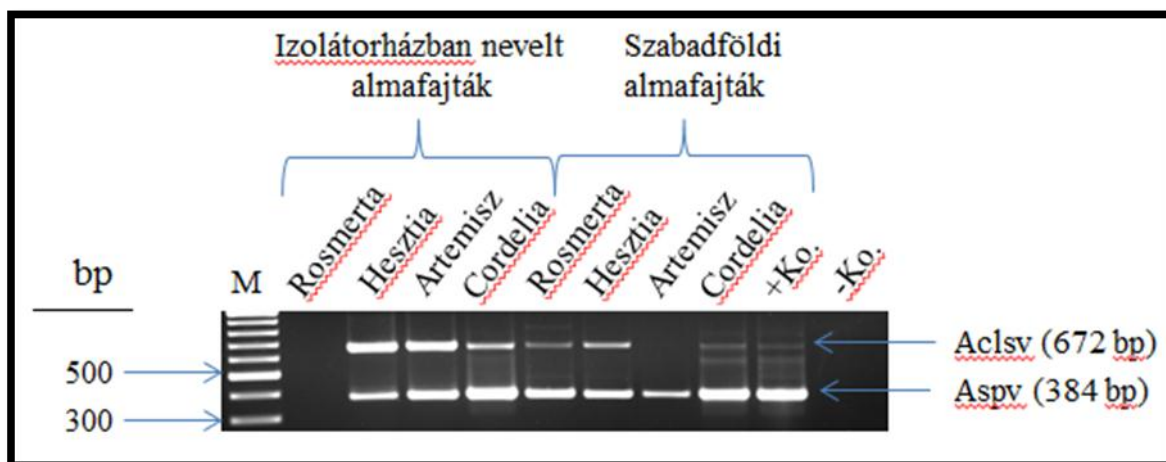
Vírusprimerek különböző párosításainak próbája.

A gélképen látható, hogy az egyedi PCR-ek jól sikerültek: egyértelműen kivehető rajtuk a vírus specifikus primerek által amplifikált termék, bár az Aclsv esetében itt is gyengébb a jel. A duplex-PCR-eknél is jól kivehetőek a várt mérettartományokban a reakció termékei. Az Aspv-t és az Asgv-t azért próbáltam ki párban, mert köztük csak 50 bp-nyi méretkülönbség volt, így kíváncsi voltam, vajon jól láthatóan különválnak-e ezek a gélképen. Az eredmények szerint ezek is jól láthatóan szétváltak, viszont nagyobb mérettartományban több műtermék is megjelenik az oszlopon, ami nehezíti a kiértékelést. Az Aclsv+Apmv+Asgv vírusok detektálására használt triplex-PCR is jól sikerült, de e mellé a 4. vírusra mindenképp kell futtatni még egy tesztet- tehát nem könnyíti/rövidíti meg a négy vírusra való szűrést. A tetraplex-

PCR sokféle méretben amplifikált fel fragmenteket, így ez nem használható (bár az Aspv és az Asgv mérettartományaiban megjelenő fragmentek itt is jól láthatók). A gékép alapján az is megállapítható, hogy azokban a mintákban, amelyek Aspv-t tartalmaztak, a várt mérettartományok mellett sokféle méretben jelennek meg egyéb fragmentek is legyen szó egyedi-, duplex-, vagy tetraplex PCR-ről. Ezt igazolja, hogy a triplex-PCR-ben, és abban a duplex-PCR-ben melyben Aspv vírusprimerek nem szerepeltek, ez a jelenség nem látható. A fenti megfigyelések eredményeképp az alma minták diagnosztikai PCR-éhez a továbbiakban az Aclsv+Aspv és az Apmv+Asgv vírusprimerek kombinációit alkalmaztam.

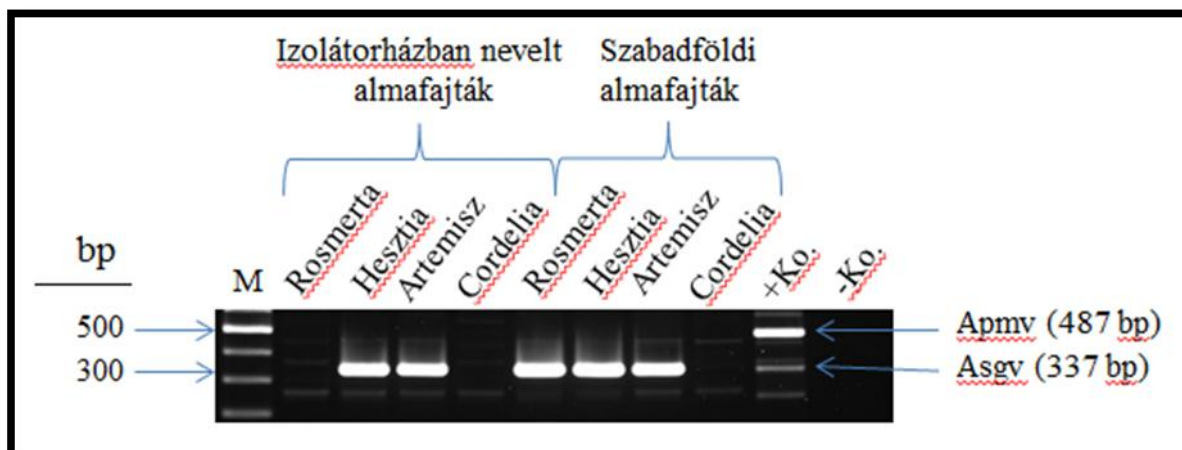
6. Vírusdiagnosztika duplex PCR-rel

Az általam optimalizált duplex-PCR segítségével teszteltem a magyar ültetvényekről származó alma mintákat, és a gödöllői Öreg Vackort a négy vírus jelenlétére. Példaként (11. és 12. ábra) izolátorházban nevelt és szabadföldi termő alma fajtajelöltek mintáinak tesztjét mutatom be.



11. ábra

Duplex-PCR Aclsv (672 bp) és Aspv (384 bp) vírusokra, az izolátorházban nevelt fajtajelölt és szabadföldi termő almamintáiból.



12. ábra

Duplex-PCR Apmv (487 bp) és Asgv (337 bp) vírusokra, az izolátorházban nevelt fajtajelölt és szabadföldi termő almamintáiból.

Minőségbiztosítási lépésként néhány kiválasztott mintából összeállítottam egyedi PCR reakciókat is, majd a PCR termékeket tisztítottam, és ezeket a BIOMI Kft-vel megszekvenáltattam. A primerek specifikus működését igazolta az, hogy minden esetben a várt vírusok szekvenciáit kaptam vissza.

A 2. táblázatban összesítettem az általam feldolgozott növényi mintákból kapott eredményeket. Ezen minták mindegyikén duplex-PCR-rel végeztem el a négy vírus detektálására optimalizált diagnosztikai eljárást, és a táblázatban az egyes vírusokra kapott pozitív eredményeket a megfelelő cellák piros kitöltésével jeleztem. Ahol a vírusprimerek által közrefogott fragmentum jelenléte nem volt egyértelmű, a cellát fehérén hagytam. Tehát a táblázatban csak azon minták vannak pirosan jelölve, melyek biztosan pozitívak az adott vírusra. Sajnos az eredmények alapján levonható az a megállapítás, miszerint az általam vizsgált mintavételi helyeken a vírusmentesítés még egyáltalán nem mondható sikeresnek. A gödöllői Öreg Vackor esetében érdekesség, hogy a négy vírus egyike sem jelent meg a PCR termékek gélképén.

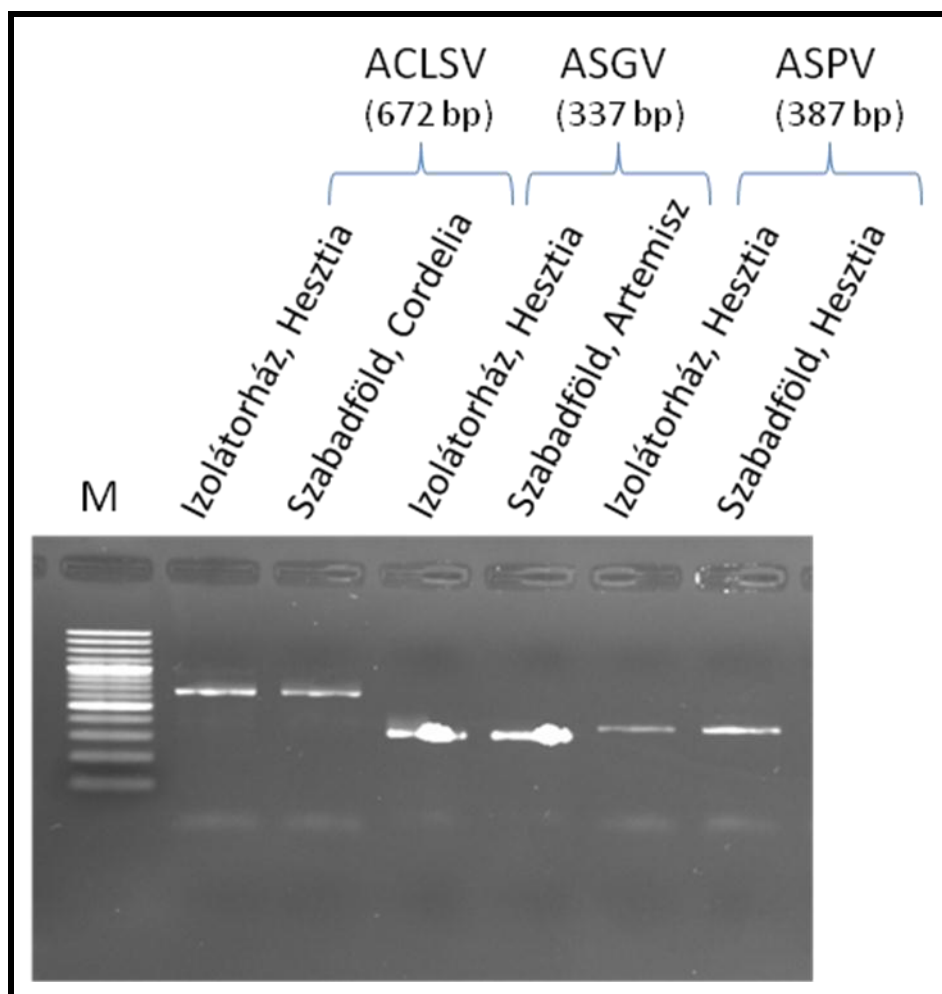
TDK_alma minták	PCR vírus specifikus oligókkal			
minta	ACLSV (672 bp)	ASPV (384 bp)	ASGV (337 bp)	APMV (487 bp)
Corvinus/ Soroksár, MT-12 II_6				
Corvinus/ Soroksár, 13_2				
Corvinus/ Vámosmikola, Idared				
Corvinus/ Vámosmikola, Golden D				
Corvinus/ Breznán, Golden D				
Corvinus/ Vámosmikola, Jonagold				
Corvinus/ Újfehértó, bio tábla				
Corvinus/ Újfehértó, rezisztens tábla				
Corvinus/ Soroksár, MT-12 44.fá				
Corvinus/ Zalaszentő, "Fuji"				
Corvinus/ Szarkahegy				
Freedom				
Gödöllői Öreg Vackorfa				
Corvinus/ izolátorház Rosmerta				
Corvinus/ izolátorház Hesztia				
Corvinus/ izolátorház Artemisz				
Corvinus/ izolátorház Cordelia				
Corvinus/ szabadföldi Rosmerta				
Corvinus/ szabadföldi Hesztia				
Corvinus/ szabadföldi Artemisz				
Corvinus/ szabadföldi Cordelia				

2. táblázat

Eredmény: alma minták tesztje a négy vírusra.

7. A felamplifikált vírustörzsek rokonsági vizsgálata

A fertőzöttnek bizonyult alma mintákból, melyeket a filogenetikai elemzésbe be szerettem volna vonni, egyedi PCR reakciók során felamplifikáltam az adott vírusok egy-egy darabját. A 13. ábrán látható ezek közül néhány 1,2 %-os agarózgélén megfuttatva:



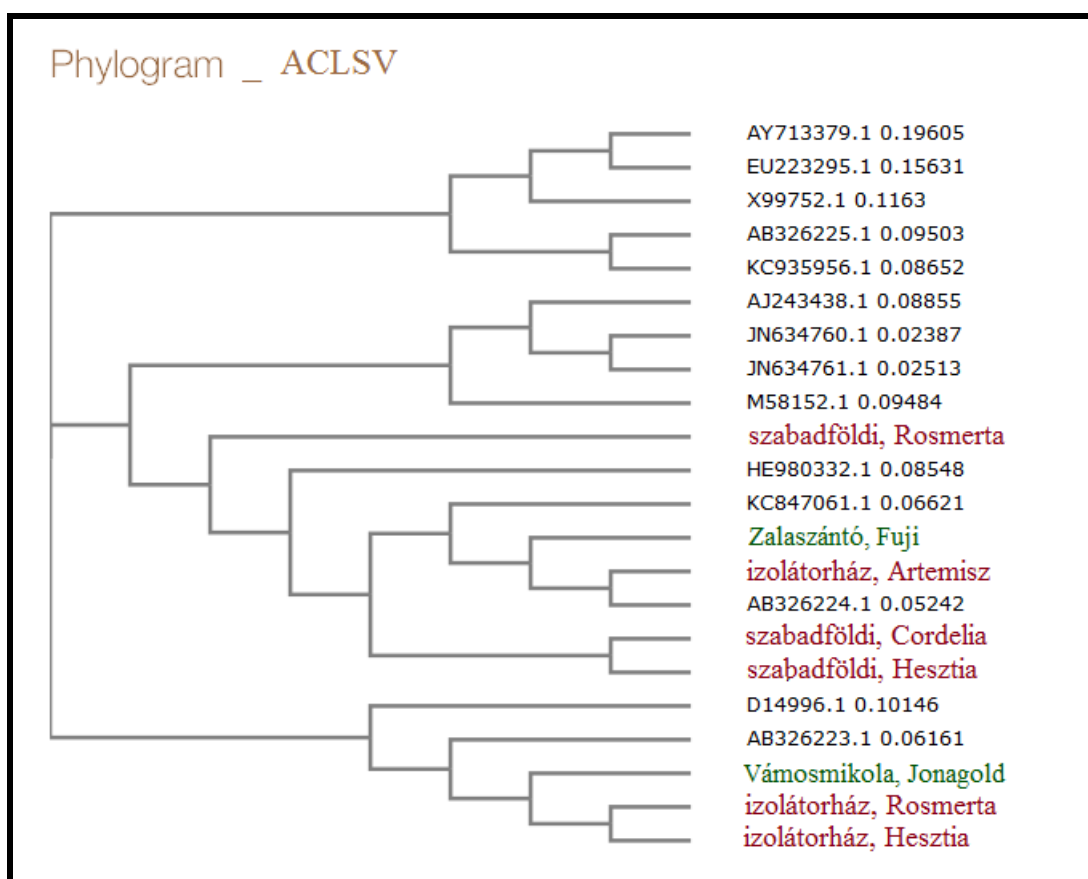
13. ábra

Izolátorházas Hesztia és szabadföldi Cordelia Aclsv vírusprimerekkel végzett egyedi PCR-ének, izolátorházas Hesztia és szabadföldi Artemisz Asgv primerekkel végzett egyedi PCR-ének és az utolsó két oszlopban izolátorházas Hesztia és szabadföldi Hesztia fajtajelöltek Aspv vírusprimerekkel végzett egyedi PCR-ének eredménye látható 1,2%-os agarózgélén. Ezeket a mintákat DNS-fragment tisztítás után megszekvenáltattam a BIOMI Kft.-vel.

A felamplifikált vírustörzsek szekvencia-darabjait ClustalOmega illesztőprogrammal hasonlítottam össze az Aclsv, az Aspv és az Asgv vírusok esetében.

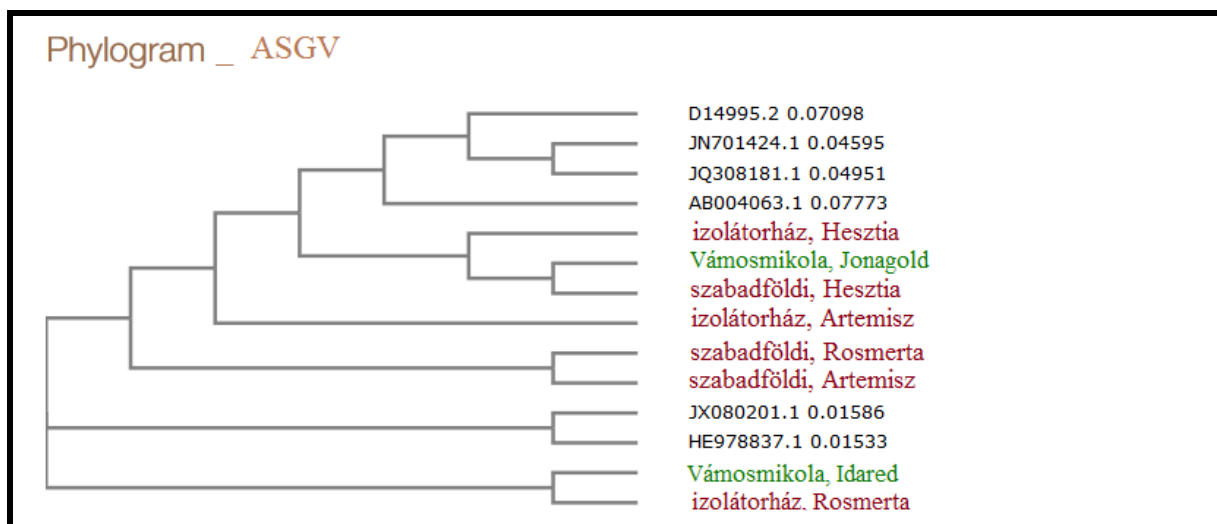
A vizsgálatba belevontam a vírusprimerek tervezésekor használt, NCBI szekvencia adatbázisban talált további törzsek szekvenciáját, illetve ahol már elkészült, ott a termőültetvényekről felsokszorozott vírusfragmentumok bázissorrendjét is.

Az Aclsv és az Asgv esetében a filogenetikai fák nem mutattak közelebbi rokonságot az izolátorházas és a szabadföldi fajtajelöltek vírusai között (13. és 14. ábrák), így valószínűleg ezen esetekben az izolátorházban és szabadföldön külön fertőződtek meg az almafák. Az ACLSV vírusoknál szembeűnő, hogy a szabadföldi minták együtt clustereződnek – illetve ez elmondható az ASGV esetében is. Ez tovább erősíti azt a feltételezést, hogy történt vírűsfertőzés a szabadföldi kiűltetést követően.



13. ábra

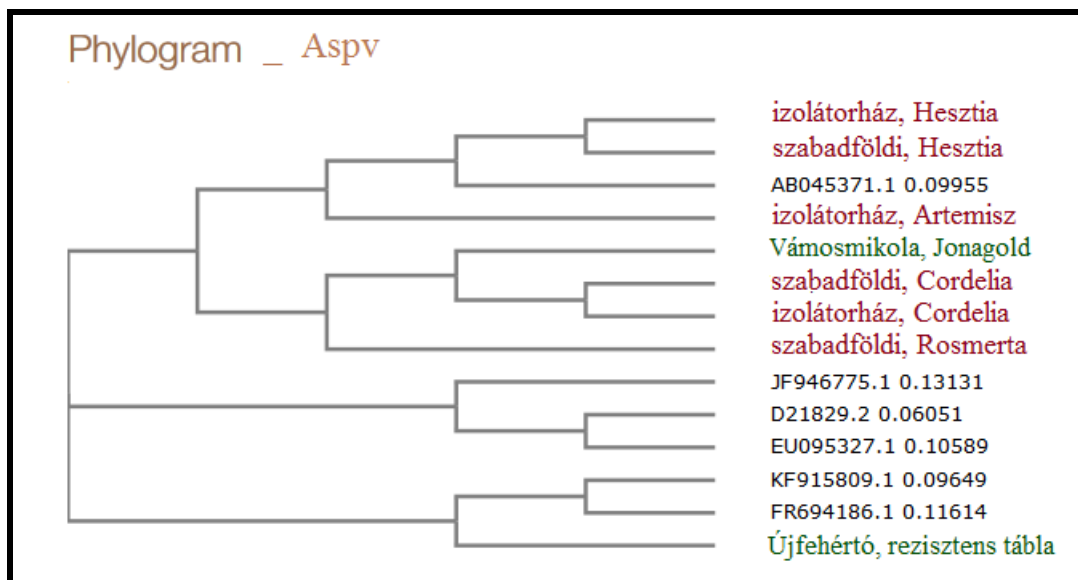
Aclsv vírus filogenetikai fája (- ahol az izolátorházas és szabadföldi fajtajelölteket vörössel, míg a termőültetvények mintáit zölddel jelöltem).



14. ábra

Asgv vírus filogenetikai fája (- ahol az izolátorházas és szabadföldi fajtajelölteket vörössel, míg a termőültetvények mintáit zölddel jelöltem).

Az Aspv vírus filogenetikai elemzésénél a Hesztia és a Cordelia fajtajelöltek estében a szabadföldi- és az izolátorházas mintákban talált vírustörzsek az illesztések alapján közeli rokonságban állnak (15. ábra), ezért lehetséges, hogy esetükben a fa már az izolátorházban fertőzött volt és később így ültették ki őket szabadföldre.



15. ábra

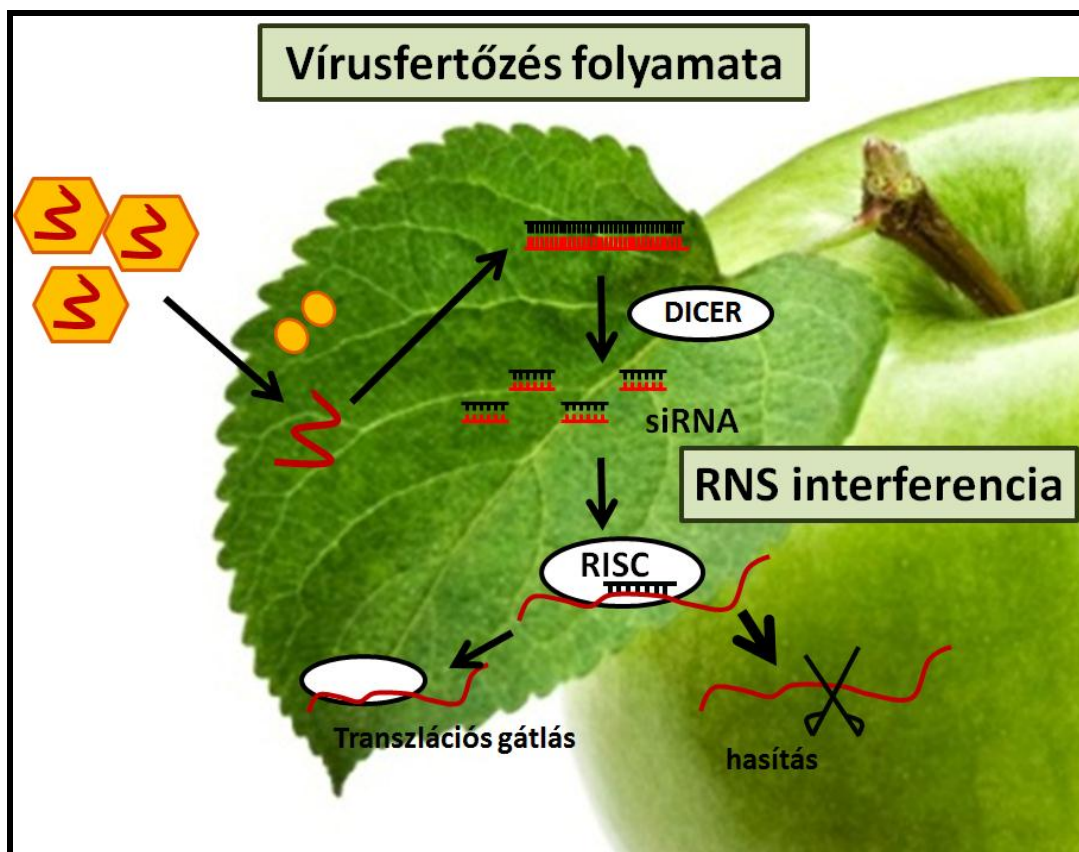
Aspv vírus filogenetikai fája (- ahol az izolátorházas és szabadföldi fajtajelölteket vörössel, míg a termőültetvények mintáit zölddel jelöltem).

Ezen fajtajelöltek esetében felmerül a gyanú, hogy már maga a vírusmentesítési folyamat sem volt kellően hatékony, illetve hogy az azt segítő vírusdiagnosztikai eljárás nem volt megfelelően érzékeny. Hatékony diagnosztikai módszert alkalmazva az Aspv vírussal fertőzött izolátorházas törzsállományból ezek a fák már nem kerülhettek volna szabadföldre fajtajelöltként.

14.A kísérletek továbbtervezése

Eddigi munkámban az ELISA-tesztet, illetve a PCR-eljárást említettem, mint a vírusdiagnosztika lehetséges módjait. Ezek elvégzése során csak egy bizonyos kórokozó jelenlétét tudtuk vizsgálni az adott növényben, ráadásul egy olyan kórokozót, melyre primert tudunk tervezni, tehát melynek genomját már többnyire feltérképezték. Ám a szekvenálási módszerek rohamos fejlődésével lehetőség nyílik arra, hogy az almából készült RNS minták, kisRNS könyvtárak bázissorrendjét nagy áteresztőképességű szekvenálással határozzuk meg. Ehhez a módszerhez nem szükséges primerek tervezése.

Az RNS-interferencia a növényekben olyan ősi, specifikus mechanizmus, melynek szerepe van többek közt a vírusokkal szembeni védekezésben is. Amikor az almát támadó RNS-vírusok az örökítőanyagukat a gazdanövénybe juttatják, a növény RNS-függő RNS-polimeráz enzime a vírus egy szálú RNS-éhez komplementer szálát épít, így abból duplaszálú dsRNS lesz (Ahlquist és mtsai., 2002). A dsRNS-t a Dicer enzim 21-25 bázispár hosszúságú kis interferáló RNS-ekre (siRNS) hasítja. Az ilyen siRNS-ek felhalmozódása a szövetekben vírushatást jelez, PTGS-t aktivál. A siRNS-ek a target RNS-ek szekvenciaspecifikus degradációját a RISC-enzimkomplex segítségével irányítják. A siRNS a RISC fő komponensével, az Argonauta fehérjével komplexet alkot, egyik szála degradálódik, a másik pedig aktiválja az enzimkomplexet. Ha a RISC a beleépült siRNS szekvenciájával teljesen, vagy közel megegyező szekvenciát tartalmazó RNS-t talál, gátolja azok transzlációját: RNázként működve hasítja azokat, vagy a transzláció elnyomását indukálja. A célzott RNS-ről (amennyiben a siRNS virális eredetű volt – vírus RNS-ről) így nemcsak hogy fehérje nem képződik, de még le is bomlik. Tehát ily módon a növény az RNS-interferenciájának képességét a vírusok elleni védekezésre képes használni (16. ábra) (Molnár és mtsai., 2005).



15. ábra

Az RNS interferencia mechanizmusa

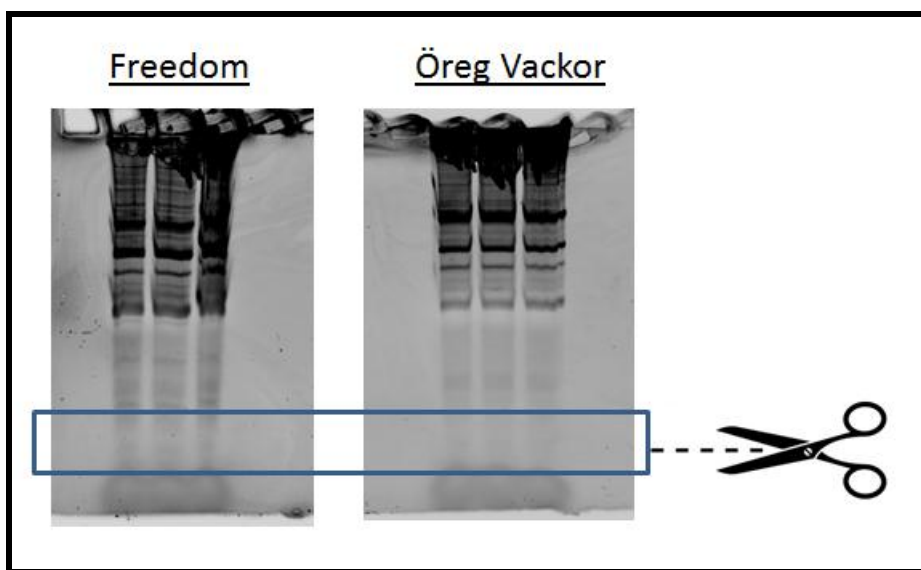
Az alma mintákból kisRNS-könyvtárat készítve a könyvtár nem csupán a növény endogén szabályozó kisRNS-eit, de az almát fertőző RNS-vírusok örökítőanyagának darabjait is tartalmazni fogja. Ezért a későbbiekben nagy áteresztőképességű szekvenálási módszerekkel szeretném az alma mintáikról készített kisRNS-könyvtárakat szekvenáltatni. Így nem csak a már ismert vírusokról, de arról is információt nyerhetünk majd, hogy milyen egyéb RNS-vírusok fertőzik almafáinkat, akár olyan kórokozókat is azonosíthatunk, melyeket almából eddig még nem írtak le (Visse és mtsai., 2014), (Adams és mtsai., 2009).

Az új generációs szekvenálások korszerű, alacsony költségű, gyors eljárások, melyek bár csak néhány 100 bázispárnyi DNS, illetve RNS fragmentumokat képesek szekvenálni, ám mivel nagy áteresztőképességű módszerek, párhuzamosan sok mintán képesek egyszerre dolgozni. Az új generációs szekvenálási módszerek közül az Illumina/ Solexa szekvenálást szeretném mintáimon alkalmazni, mely során a DNS egyik végére timin túlnyúló véget tartalmazó adapter DNS-t ligálnak, mely alapján a DNS-szálak a szekvenáló lemez komplementer primereihez képesek hibridizálni. Ezek a továbbiakban templátként szolgálnak, erről szintetizálódik az új DNS. Az DNS szálakat „bridge-PCR” módszerrel lokálisan felamplifikálják.

Ezután a tényleges szekvenálás úgy történik, hogy az elongációkor fluoreszcens dNTP-eket használnak és ezek jelét leolvasva történik a szekvencia meghatározás. A módszer különlegessége abban rejlik, hogy a lokálisan létrehozott kolóniák nagy mennyiségben tartalmazzák a keresett szekvenciát. Ebben rejlik az eljárás érzékenysége is: a bázissorrend leolvasása után a már ismert szekvenciákhoz illesztik őket, majd lefedettségük alapján határozzák meg az egyezés mértékét. A kapott szekvenciák bioinformatikai analízissel vizsgálhatók tovább.

A kisRNS könyvtár készítésének a lényege, hogy a kinyert kisRNS kivonathoz specifikus adaptert kell ligálni és a jelet PCR reakcióval kell felamplifikálni. Már két kisRNS könyvtárat sikerült elkészítenem (próbaképp egy újfehértói Freedom almaültetvény, illetve a Gödöllői Öreg Vackorfa mintájából), a jövőben a fajtajelöltek és a termőültetvények mintáin szeretném ugyanezt elvégezni.

Elsőként a teljes RNS-frakciót 8%-os, ureás akrilamid-gélen méret szerint elválasztottam, majd UV-fény alatt, a referenciaként szolgáló xilén-cianol és brómfenolkék festék alapján kivágtam a kis RNS mérettartományt (16. ábra).



16. ábra

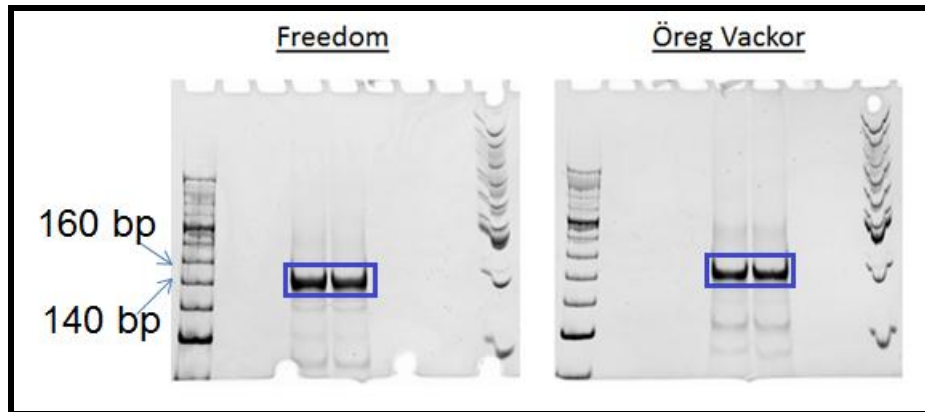
KisRNS mérettartományának kivágása a referencia festék (a kék keretezés alatt látható sötét csík) alapján, 8%-os, ureás akrilamid gélből

A kivágott géldarabokból visszaoldtam és kicsaptam a kisRNS-t. Ebből készítettem el a kis RNS-könyvtárakat az Illumina TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit-et használva:

- A kisRNS-ek 3' végéhez adaptereket ligáltam.
- Az 5' végi adaptert külön, következő lépésként ligáltam.
- Reverz transzkripcióval cDNS-t készítettem.

- A cDNS könyvtár szekvenciáit PCR reakcióval amplifikáltam, egyedi index-szekvenciával láttam el.
- A kisRNS könyvtárakat PCR reakcióval felszaporítottam.

A kisRNS könyvtárak minőségének ellenőrzésekképpen 8%-os akrilamid gélen megfuttattam a mintákat. A várt termékek az ellenőrző festékek két mérettartománya, 140 és 160 bázispár közt helyezkedtek el (17. ábra):



17. ábra

KisRNS könyvtárak ellenőrző futtatása 8%-os akrilamid gélen

A kivágott géldarabokból a kisRNS könyvtárakat kivontam, majd szekvenálásra küldtem. A szekvenálás előtt a kisRNS könyvtárak minőségellenőrzését a szekvenálást végző UD Genomed (Debrecen) végezte. Tesztjükből (18. és 19. ábra) látszik, hogy a kisRNS könyvtáraim jól sikerültek, habár a Freedom-könyvtár koncentrációja alacsony lett.

Freedom

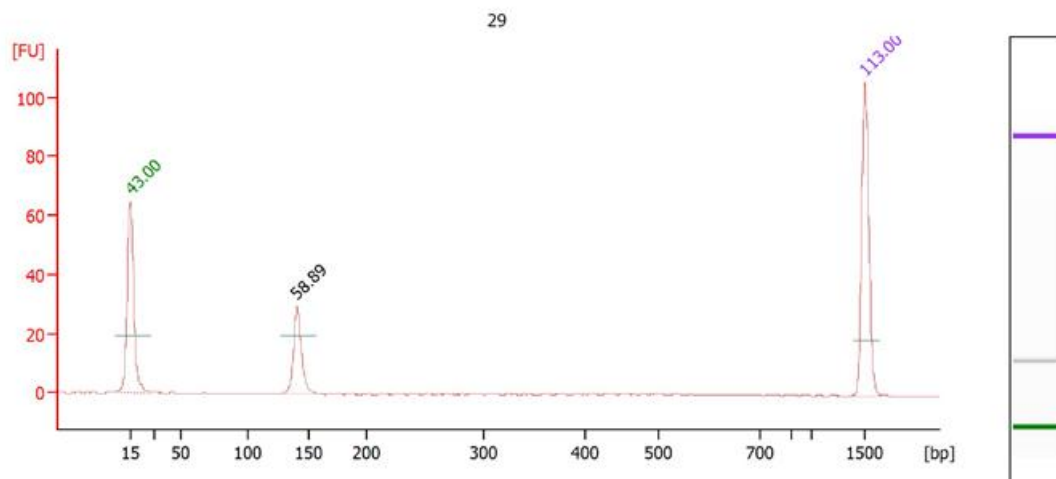
2100 expert_DNA 1000_DE34903783_2014-10-15_09-05-44.xad

Page 9 of 17

Assay Class: DNA 1000
Data Path: C:\...-15\2100 expert_DNA 1000_DE34903783_2014-10-15_09-05-44.xad

Created: 10/15/2014 9:05:44 AM
Modified: 10/15/2014 10:11:00 AM

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 5 : 29

Number of peaks found: 1

Peak table for sample 5 : 29

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	141	1.47	15.8	
3	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

Illumina-ellenőrző
gélkép:



18. ábra

Az újfehértói Freedom alma ültetvénypool kisRNS könyvtár szekvenálásának ellenőrzése

Vackor

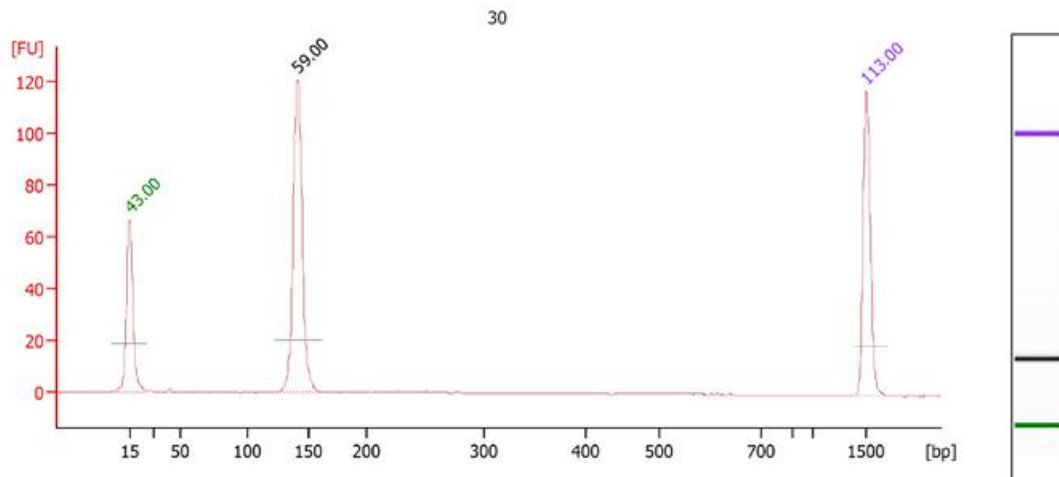
2100 expert_DNA 1000_DE34903783_2014-10-15_09-05-44.xad

Page 10 of

Assay Class: DNA 1000
Data Path: C:\...-15\2100 expert_DNA 1000_DE34903783_2014-10-15_09-05-44.xad

Created: 10/15/2014 9:05:44 /
Modified: 10/15/2014 10:11:00 /

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 6 : 30

Number of peaks found: 1

Peak table for sample 6 : 30

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	142	6.08	65.0	
3	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

Illumina-ellenőrző
gélkép:



19. ábra

Az Öreg Vackor kisRNS könyvtár szekvenálásának ellenőrzése

Munkámat az almamintákból készült kisRNS könyvtárak szekvenálásával és a kapott adatok bioinformatikai analízisével tervezem folytatni.

Ezen eredmények birtokában átfogó képet kaphatunk a mintáinkban előforduló vírusokról, viroidokról, még ismeretlen kórokozókról és tovább vizsgálhatjuk a fajtajelöltek vírusfertőzöttségének okát. Az elemzések során kidolgozott „pipeline” pedig reményeink szerint optimalizálható lesz a vírusmentesítési protokollok folyamatos tesztelésére, így hatékonyabbá tételére.

IV. Összefoglaló

Haszonnövényeink a vírusok állandó támadásának vannak kitéve, melyek ellen növényvédő szerekkel nem védekezhetünk. Gyümölcsfáink szaporítása a fajtafenntartás miatt vegetatíván történik, ha az anyató fertőzött a vírus továbbterjed a szaporítóanyaggal. Magyarországon az almafák törzsültetvényeinek létrehozása előtt éppen ezért kötelező az anyanövények vizsgálata, és mentesítése a gyümölcsösöket fertőző RNS vírusokra.

Célom az volt, hogy olyan RT-PCR alapú módszert dolgozzak ki, melynek segítségével minél hatékonyabban, olcsóbban és gyorsabban lehet a kötelezően tesztelendő vírusokat diagnosztizálni az almafákból vett mintákból.

Munkámat azzal kezdtem, hogy az almára optimalizáltam egy RNS-kivonási eljárást, majd a tisztított RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettem. A cDNS minőségét aktin primerekkel végzett PCR reakcióval ellenőriztem. Az alma vírusok kimutatásához az NCBI adatbázisban található vírusszekvenciák összehasonlítása alapján terveztem primereket. Gradiens PCR eljárással megkerestem a vírus primerek működéséhez leginkább megfelelő hőmérsékletet, majd a specifikus primereket különböző kombinációkban is teszteltem. Ebből kiderült, hogy az almákat fertőző 4 vírusra a duplex PCR jól használható módszer, így mintáim diagnosztikai kiértékelésére is ezt használtam. A különböző mintákból szintetizált PCR termékek bázissorrendjét DNS-tisztítás után határozottam meg. A kapott szekvenciák alapján Clustal Omega programmal elvégeztem az egyes vírustörzsek szekvenciáinak összehasonlítását, és ez alapján vizsgáltam leszármazási viszonyait.

A fentiekben kidolgozott duplex PCR eljárás a vírusok szűrésének az általánosan használt ELISA módszernél hatékonyabb és specifikusabb módja, mellyel almafáink a kötelezően tesztelendő vírusok jelenlétére vizsgálhatóak. A PCR termékek bázissorrendjének összehasonlítása lehetővé tette a vizsgált vírusok különböző törzseinek elemzését is.

További terveimben szerepel, hogy az alma mintákból kisRNS-könyvtárakat készítsék. Új generációs szekvenálással (Next Generation Sequencing - NGS) szeretném feldolgozni ezeket a könyvtárakat, melyekben a növényi gazda-RNS-en kívül az esetleges kórokozók RNS-ei is megtalálhatók. Ez a módszer lehetőséget ad akár új, eddig ismeretlen vírusok megtalálására, elemzésére.

V. *Summary*

Our crop plants are exposed to permanent attack of viruses, against plant protection methods are incapable to defend. Propagation of fruit trees is made in a vegetative way because of maintenance of species – if mother plant is infected, the virus can spread by propagation material. That's why in Hungary, during foundation of apple stock nurseries, it's obligatory to examine mother plants for the presence of the most widespread viruses and use curative treatments to achieve virus free plant material

Aim of my research was to elaborate a diagnostic method based on RT-PCR reaction, in order to test the presence of these viruses efficiently, in a cheap and fast assay and to get a picture about the state of viral infection of Hungarian apple plantations.

My work started with the optimization of an RNA extraction method for apple. The extracted RNA was used to synthesize cDNA using reverse transcription. Quality of cDNA was tested by PCR reaction made with apple specific actin primers. To detect apple viruses primers were designed based on the comparison of virus sequences present in NCBI database. Optimum annealing temperature of virus primers were determined by gradient PCR test, primer pairs were tested both individually and in combinations. Becoming evident that duplex PCR is a suitable method to detect apple viruses I used it on my samples for diagnostic evaluation. PCR products synthesized from different samples were purified and their sequence was determined. Alignments of virus sequences from different samples were investigated by Clustal Omega program to reveal their lineage relationship.

According to our results duplex-PCR is an appropriate virus diagnostic method –more efficient and more specific than ELISA, and suitable for testing our apple trees for the presence of known viruses. The generated PCR product can serve as a base for analysis of different strains of examined viruses.

In the future I would like to prepare siRNA-libraries from apple samples, where RNAs not only from the host plant but also from pathogens are present. New generation sequencing (with Illumina platform) of siRNA-libraries and their evaluations give us a possibility to identify total viral pathogens from our samples, and even to find and analyse new, unknown viruses.