RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása az alma vírusfertőzöttségének kimutatására

(TDK-dolgozat)

Készítette: Varga Tünde

ELTE TTK, Biológus MSc

Témavezető: Dr. Várallyay Éva

tudományos főmunkatárs, NAIK-MBK

2014

Tartalom

I. Összefoglaló 4

II. Bevezetés és célkitűzések 5

III. Anyag és módszer 6

1. Növényi minták 6

2. RNS kivonás 6

3. cDNS szintézise reverz transzkripcióval 8

4. Primer tervezés Malus domestica aktin mRNS-re 8

5. cDNS minőségének ellenőrzése (Aktin teszt) 8

6. Primer tervezés a négy alma karantén vírusra 9

7. Az almavírus primerek anellálásához megfelelő hőmérséklet megkeresése - Gradiens PCR 10

a) Alma RT Pool készítés: 10

b) PCR-Gradiens 45-65°C: 10

8. Diagnosztikai PCR reakció a 4 alma vírusra 10

9. Vírusdiagnosztika alma mintákon duplex-PCR-rel 11

10. PCR termékek tisztítása és szekvenálása 11

IV. Eredmények és megvitatásuk 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 14

5. PCR-vírus primerek különböző kombinációinak tesztelése 15

6. Vírusdiagnosztika duplex PCR-rel 17

7. A kísérletek továbbtervezése 19

V. Szerzői hozzájárulás 20

VI. Irodalomjegyzék 21

Köszönetnyilvánítás 22

Szerzői nyilatkozat 23

I. Összefoglaló

Haszonnövényeink a vírusok állandó támadásának vannak kitéve, melyek ellen növényvédő szerekkel nem védekezhetünk. Gyümölcsfáink szaporítása a fajtafenntartás miatt vegetatívan 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 megbízhatóbban, 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 fentiekben kidolgozott duplex PCR eljárás a vírusok szűrésének az általánosan használt ELISA módszernél hatékonyabb és specifikusabb módja, mellyel almafáink a karantén vírusokra tesztelhetők.

II. 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 terméshozamra, 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 növényvédőszerek 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 (Salamon, 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 belépni, így az ebből nevelt *in vitro* növények is vírusmentesek lesznek. Az ilyen elsődleges tenyészetekből többlépéses 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 törzsültetvényeken alkalmazott, vírusok szűrésére használt diagnosztikai eljárás (Horváth és Gáborjányi, 1999).

A vírusok detektálására a kötelező hatósági szűrések során főként ELISA teszteket alkalmaznak, melyek a vírus köpenyfehérjéjét 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 teszteket 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 fehérjéké, illetve a vírus RNS-ek tartalmaznak az adott vírusra jellemző konzervatív szakaszokat. Az ilyen ritkán mutálódó konzervatív szakaszokra tervezett specifikus primereket használva a PCR-alapú eljárások az ELISA teszteknél 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-teszteknél (Berniak és mtsai., 2009). Ezért tehát célszerű a nukleinsav-alapú diagnosztikai módszerek kidolgozásával és fejlesztésével foglakozni.

Kísérleteim két 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 törzsültetvények almafáin.

III. Anyag és módszer

1. Növényi minták

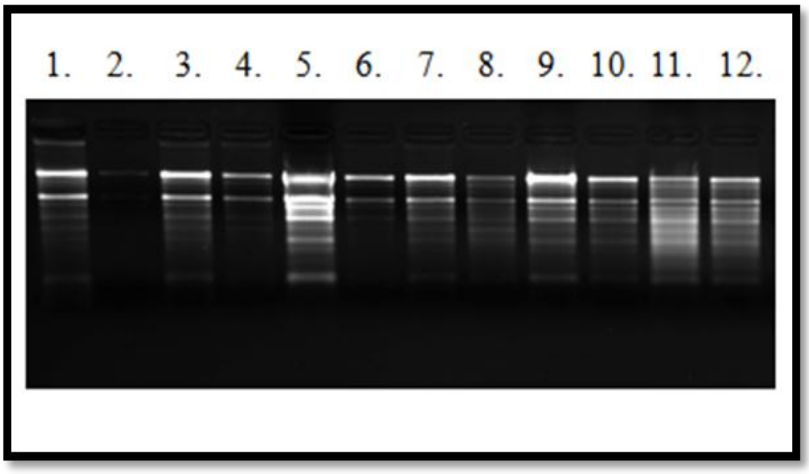
A kísérleteket magyarországi alma mintákon végeztem, melyeket együttműködő partnereink a Corvinus Egyetem kutatói gyűjtöttek szabadföldi termő és törzsültetvényekről, illetve izolátorházban nevelt fajtajelöltekről. A vizsgálatba bevontam a 2014-ben Magyarország fája címet nyert 280 éves gödöllői Öreg 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°CTAB+ 2,5%PVP+ 100mM Tris-HCl+ 25mM EDTA+ 2M 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 ültetvénypoolt készítettem. Az 1. ábrán a Corvinus Egyetem szabadföldi törzsültetvényről származó Artemisz fajta RNS tisztításának gélképe látható.



1. ábra

Szabadföldi törzsültetvényekről származó Artemisz almafajta RNS tisztításának eredménye: agaróz gélelelktroforezissel 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 µl random primerhez templátként 500 ng tisztított RNS-t adtam, majd MQ-val 3,12 µl-re egészítettem ki az oldatot és jégre tettem. Gyors centrifugálás után denaturáltam (5 perc, 65°C). Utána jégen hozzáadtam 1,88 µl-t a következő keverékből: mintánként 1 µl 5x Reaction buffer + 0,5 µl 10 mM dNTP + 0,125 µl Ribolock RNáz inhibítor + 0,25 µl 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 higítottam (2µl cc.RT + 18 µl 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, hogy ne legyen sok (> 3db) bázisismétlődés a primerszekvenciában, és hogy az illesztett szekvenciák olyan részeire essen a primer 20 bp-nyi szakasza, ahol lehetőleg nincs, vagy kevés a különböző törzsek szekvenciái között a variáció (illeszkedési hiba). A két szakasz alkalmasságát PCR Primer Stats programmal ellenőriztem le (hőmérséklet optimum, stb.).

5. cDNS minőségének ellenőrzése (Aktin teszt)

Ahhoz, hogy leellenőrizzem 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: GGAACTGGAATGGTGAAGGC; 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 kontrolként cDNS-es helyett MQ vizet használtam. 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 gélelektroforezissel 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 Genebank-ben található vírus szekvencia illesztését vettem figyelembe. A négy vírusra tervezett primerek szekvenciái:

Aclsv6853s: AGACCCCTTCATGGAAAGACAGG;
Aclsv7525as: CTATTTATTATAAGTCTAAACACT
Apmv1295s: CCGTGAGGAGGACAGCTTGG
Apmv1779as: CAGATCTTCATCGATAAGTAGAAC
Aspv1169s: CTGGAACCTCATGCTGCAAACTC
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 µl-t összemértem, így összesen 30 µl 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	56,7 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 µl MQ-t, 3,0 µl 5xPhire Green Reaction Buffert, 0,75 µl (10 pmol/µl) vírus sense primert, 0,75 µl (10 pmol/µl) vírus antisense primert, 0,3 µl 10mM dNTP-t, 0,3 µl Phire Hot Start II DNA Polymerase enzimet és 0,5 µl 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 és szekvenálása

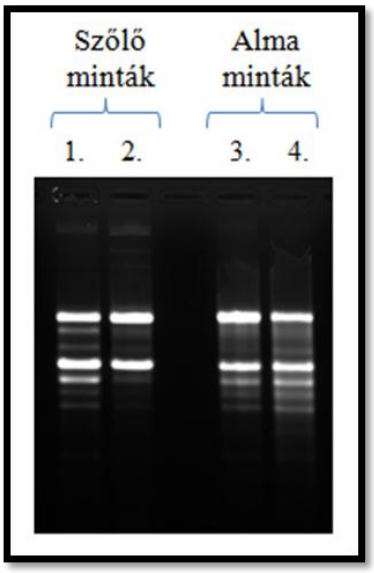
A PCR során keletkezett termékek bázissorrendjét meghatároztattam, hogy igazoljam: valóban a keresett vírusokat szaporították fel a vírusok kimutatására tervezett specifikus primereim. Szekvenálás előtt a DNS mintáimat a Geneaid PCR DNA Fragments Extraction Kit használatával (a PCR Clean Up Protocol kitleírás alapján) tisztítottam meg a mintákban maradt enzimtől és be nem épült nukleotidoktól. Röviden: 47 µl PCR termékhez 250 µl DF puffert adtam. Ezt az elegyet DF oszlopba pipettáztam át, majd lecentrifugáltam (30 msp., 14.000 rpm). Az átfolyó leöntését követően 600 µl 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 µl 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 az NCBI BLAST oldalának segítségével hasonlítottam össze a specifikus vírus primerek tervezéskor már használt vírusszekvenciákkal. Az összehasonlítás eredménye mindig azt mutatta, hogy a PCR reakció által felsokszorozott DNS termék valóban a keresett vírusból való.

IV. Eredmények és megvitatásuk

1. RNS kivonás

Laborunk szőlővírusok diagnosztikájával foglalkozik, mely során az RNS kivonáshoz a Gambino és munkatársai által kifejlesztett protokollt alkalmazzuk (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 (2. ábra). Az RNS tisztítási módszerünkkel, 0,1-0,15 g növényi szövetből kapott kivonat a szövet minőségétől függően általában 250-500 ng/ µl RNS-t tartalmazott.

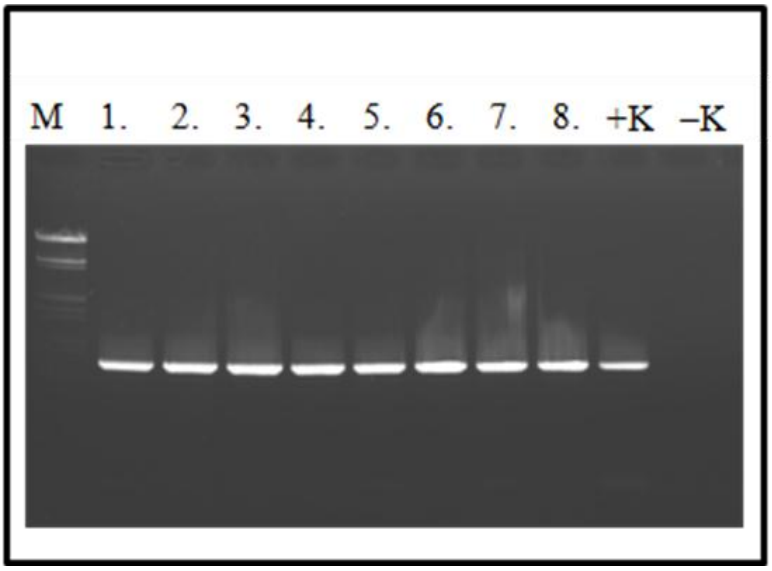


2. ábra

A laborunk által módosított 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 (3. ábra).



3. ábra

Alma minták cDNS szintézisének minőségellenőrzése aktin primerekkel.

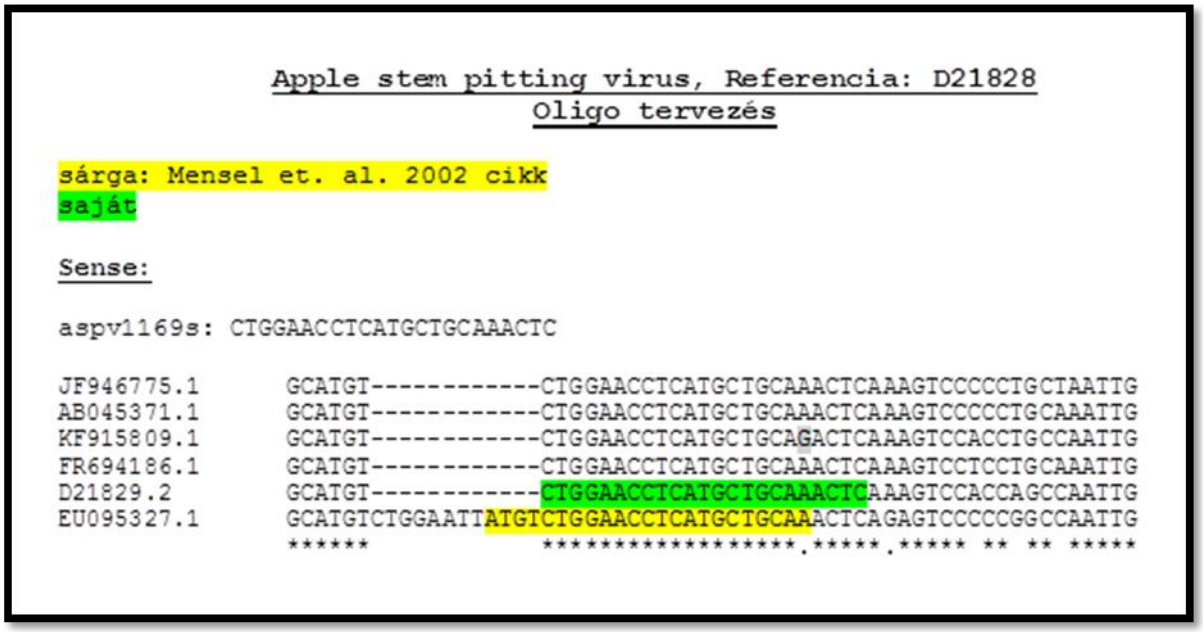
M: mólsúly marker, +K: jó cDNS templát, -K: MQ

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, összevetettem 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.

A 4. 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 adenozin. Ezen kívül előfordultak hosszabb bázisismétlődések is, például a Menzel és munkatársai által használt Asgv antisense primer esetében: „AACCCCTTTTTGTCCTTCAGTACGAA" (Menzel és mtsai., 2002). Ezeket a hibákat szerettem volna saját primereimben kiküszöbölni.

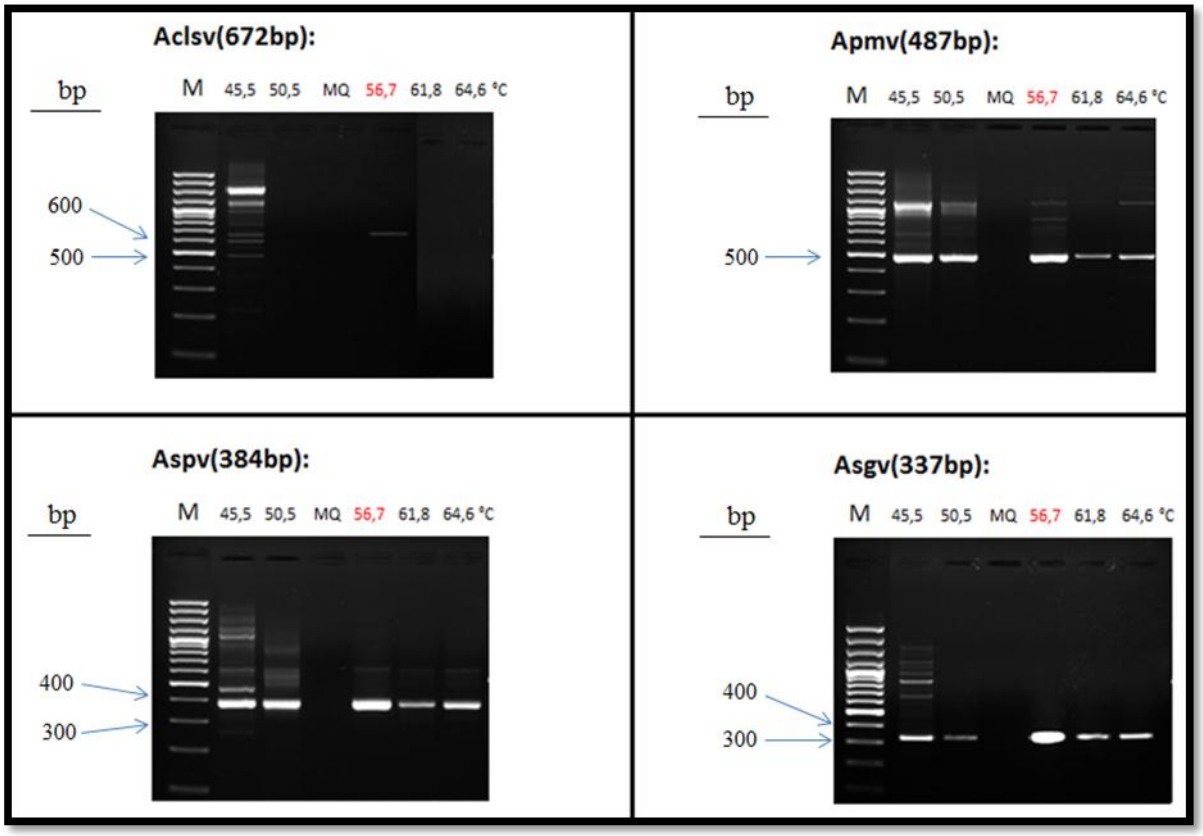


4. ábra

Az NCBI adatbázisban található 6 ASPV vírus szekvenciájának illesztése CLUSTALW programmal. (részlet)

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 (5. 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.

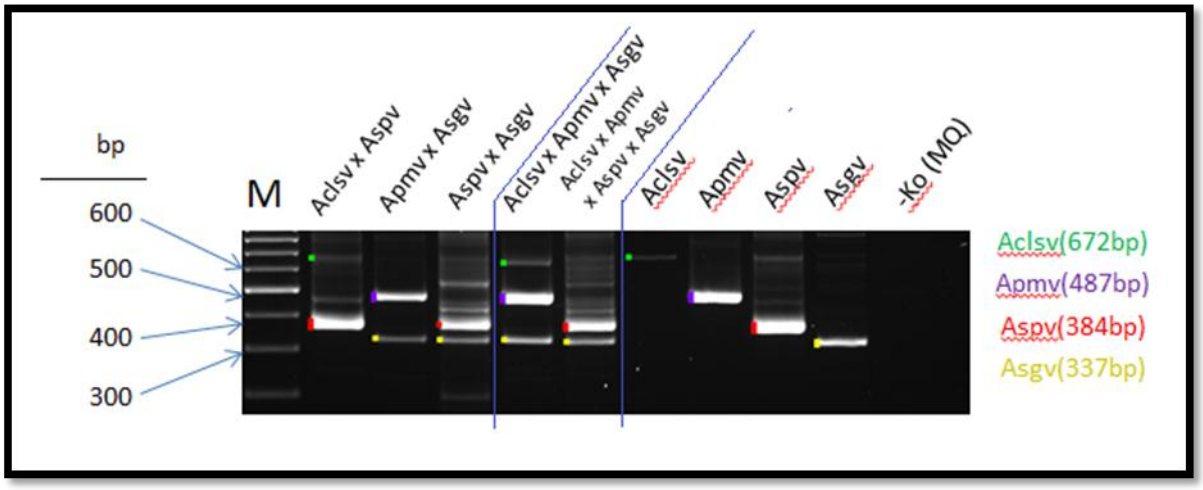


5. ábra

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 (6. ábra).



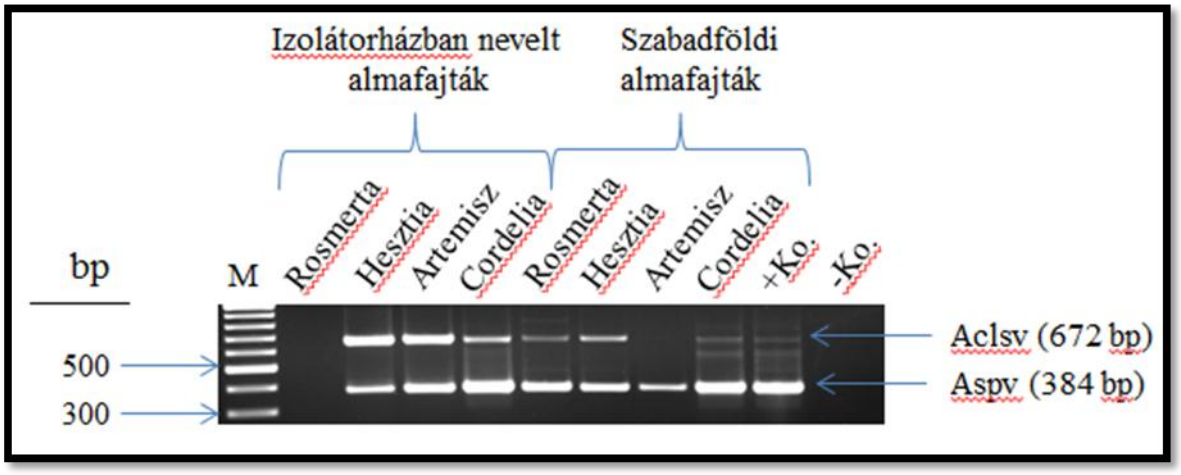
6. ábra

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 kivehetők 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 gélkép 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.

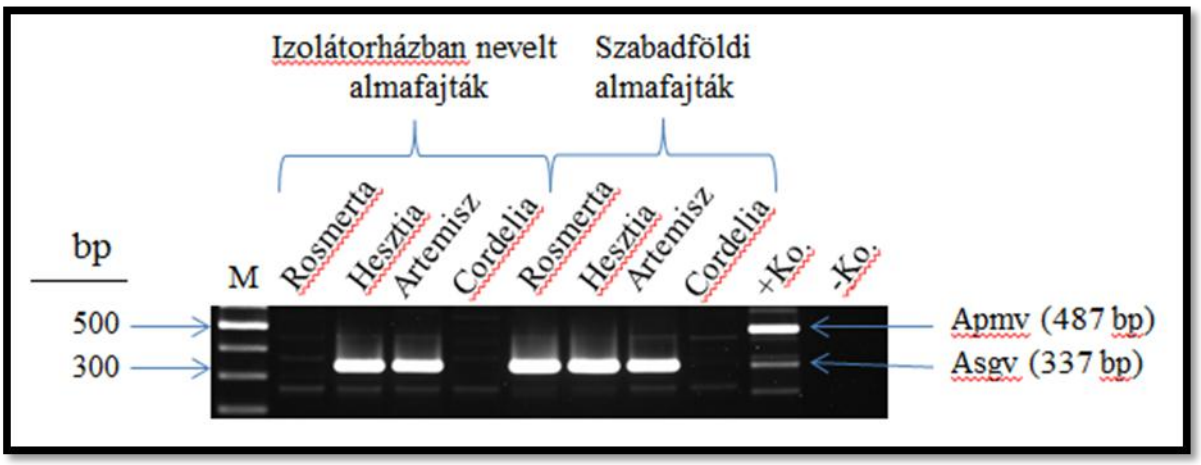
6. Vírusdiagnosztika duplex PCR-rel

Az általam optimalizált duplex-PCR segítségével teszteltem a magyar ültetvényekről származó alma mintákat, és a gödöllői Öreg Vackort a négy vírus jelenlétére. Példaként (7. és 8. ábra) izolátorházban nevelt és szabadföldi termő alma fajtajelöltek mintáinak tesztjét mutatom be.



7. ábra

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



8. 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 szürke kitöltésével jeleztem. Ahol a vírusprimerek által közrefogott fragmentum jelenléte nem volt egyértelmű, a cellát fehéren hagytam. Tehát a táblázatban csak azon minták vannak szürkén 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/ Breznan , Golden D				
Corvinus/ Vámosmikola, Jonagold				
Corvinus/ Újfehértó, bio tábla				
Corvinus/ Újfehértó, rezisztens tábla				
Corvinus/ Soroksár, MT-12 44.fa				
Corvinus/ Zalaszántó, "Fuji"				
Corvinus/ Szarkahegy				
Freedom				
Vackor				
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 kísérletek továbbtervezése

Az ELISA tesztek és a PCR- eljárások elvégzése során egy bizonyos kórokozó jelenlétét vizsgáljuk az adott növényben. A szekvenálási módszerek rohamos fejlődésével lehetőség nyílik arra, hogy az alma RNS minták, kisRNS könyvtárak bázissorrendjét nagy áteresztőképességű szekvenálással határozzuk meg és így megtudjuk, hogy milyen vírusok fertőzik az adott növényt. Így teljesen új patogéneket, illetve olyan kórokozókat azonosíthatunk, melyeket az adott növényen eddig még nem írtak le. (Visse és mtsai., 2014), (Adams és mtsai., 2009). A továbbiakban a mintáinkból készült kisRNS könyvtárak szekvenálását és a kapott adatok bioinformatikai analízisét tervezzük.

V. Szerzői hozzájárulás

- Alma minták RNS tisztítása után RT-PCR alapú módszerrel cDNS-t készítettem, melynek minőségét saját tervezésű specifikus alma aktin RNS primereimmel ellenőriztem.

- Specifikus vírusprimereket terveztem Aclsv, Apmv, Aspv és Asgv almavírusokhoz, melyek anellálásához optimális hőmérsékletet Gradiens PCR módszerrel állapítottam meg.

- PCR reakcióval kipróbáltam hogyan működnek vírusprimereim egyedi-PCR-ben, illetve különböző kombinációkban multiplex-PCR-ben.

- Az optimalizált duplex-PCR módszert alkalmaztam különböző hazai izolátorházban tartott prebázis, valamint szabadföldi termő és törzsültetvények almafáin.

VI. Irodalomjegyzék

Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M. and Boonham, N. (2009) Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. Molecular Plant Pathology 10(4), 537-545.

Berniak, H., Malinowski, T., Kamińska, M. (2009) Comparison of ELISA and RT-PCR assays for detection an identification of cucumber mosaic virus (CMV) isolates infecting horticultural crops in Poland. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research Vol. 17/(2), 5-20

Gambino, G., Perrone, I. and Gribaudo, I. (2008) A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. Phytochemical Analysis 19(6), 520-525.

Hassan, M., Myrta, A. and Polak, J. (2006) Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 133(2), 124-129.

Horváth, J., Gáborjányi, R. (1999) Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó

Malinowski, T. (2005) Potential problems with the reliability of PCR based diagnostic methods related to plant viruses sequence variation. Phytopathologia polonica 35: 125–139

Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99(1-2), 81-92.

Salamon, P (2007) Növényvírusok, viroidok és szatellitek osztályozása és nevezéktana. Növényvédelem 2007 különszám

Visser, M., Maree, H. J., Rees, D. J. and Burger, J. T. (2014) High-throughput sequencing reveals small RNAs involved in ASGV infection. BMC Genomics 15, 568.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék elsőként köszönetet mondani témavezetőmnek, Várallyay Évának, aki lépten-nyomon érdeklődve követi és nagy odafigyeléssel segíti fejlődésemet, munkám során mindig lelkesít és hasznos tanácsokkal lát el.

Ezúton is szeretném megköszönni csoportunk minden tagjának, hogy bármi gondom legyen is, ők azonnal segítenek nekem, és jelenlétükben mindig kellemesen telik a munka.

Hálás vagyok családomnak, aki mindig magas, de elérhető elvárásaival hajt előre, és gimnáziumi biológiatanáromnak, aki nem csak tanította, hanem meg is szerettette velem ezt a tudományterületet.

Szerzői nyilatkozat

Név: Varga Tünde

Neptun azonosító: R8M0WG

ELTE Természettudományi Kar, **Biológus mesterszak**

TDK dolgozat címe: RNS alapú diagnosztikai módszer kidolgozása az alma vírusfertőzöttségének kimutatására

A TDK dolgozat szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

– szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;

– tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;

– más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Budapest, 2014. 10. 17

Varga Tünde

a hallgató aláírása