

## ÚJ DIAGNOSZTIKUM A SZILVA HIMLŐ VÍRUSÁRA

**Palkovics László, Burgyán József és Balázs Ervin**

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,  
2101 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

A csonthéjas gyümölcsök termesztését talán legjobban gátló vírusbetegség azonosítására szendvicshibridizációs tesztet fejlesztettünk ki. A nukleinsav hibridizáció az RNS–RNS hibridizáción alapul, amikor a kimutatandó vírus RNS-t két *in vitro* szintetizált komplementer RNS ejt csapdába. Ezek közül az egyik (elfogó RNS) biotinnal jelölt, és szilárd fázishoz (ELISA lemez) köti a szendvicskomplexet, lehetővé téve az extenzív tisztítási lépéseket, míg a másik szintetikus RNS-be digoxigeninnel jelölt nukleotidokat építünk. A digoxigenin elleni antitestekhez kötött alkalikus foszfatáz konjugátum segítségével a vírus kimutatását az ELISA technikában már jól ismert kolorimetrikus reakcióval végezzük el. A fentiekben említett „szendvicshibridizációs teszt” segítségével a kimutathatósági határ  $10^7$  vírus RNS molekula/minta. Különböző gyümölcsfajok rügymintáit vizsgálva a szendvicshibridizációs teszt az ELISA tesztben negatívnak mutatózó minták 50%-ában vírusfertőzöttséget mutatott ki és érzékenységi vizsgálatok a kidolgozott diagnosztikum megközelítette a legérzékenyebb radioaktív jelölésű módszerek érzékenységét.

A növénypatogének kimutatására a világon mindenütt széles körben elterjedtek az immunológiai alapú diagnosztikumok. Az elmúlt évtized óta szinte kivétel nélkül minden karantén laboratóriumban használják az ELISA technika legkülönbözőbb formáit (Van Regenmortel 1981). A növényi vírusok detektálására is éppen a módszer egyszerűsége és megbízhatósága miatt az ELISA technikákat használják. A technika elterjedésével egyidőben derült ki, hogy az ELISA alkalmazásának korlátai vannak. Számos kérdés vetődött fel, így többek között a rendszer alkalmazhatatlansága a fehérjeburok nélküli „vírusok”, a viroidok kimutatására. A legtöbb vírus kimutatásához ma még csak poliklonális ellenanyaggal rendelkezünk, amelyek a növényekben található fehérjékkel keresztreakciót adva megnehezítik a vírus detektálását (Jaegle és Van Regenmortel 1985). Közismert az is, hogy néhány vírus igen alacsony titerben található meg a fertőzött növényben, míg mások instabilak a növényi szövetnedvben és ezért kimutatásuk rendkívül nehéz, de hátráltatja a növényi vírusok kimutatását az is, hogy egyes vírustörzsek nagyon rossz immunogénnek bizonyulnak.

A molekuláris biológia technikai fejlődésével lehetővé vált a növényi vírusok klónozása, elsődleges szerkezetének meghatározása és olyan módszerek alkalmazása, amelyek nagy biztonsággal képesek kimutatni néhány példányban jelenlévő nukleinsav szakaszt is. Az Orion Biotechnológiai Cég bevezette a humán papillóma vírus kimutatására a kettős szendvic nukleinsav-hibridizációs tesztet, amelynek elvét követve fejlesztettük ki módszerünket a Magyarországon súlyos károkat okozó szilva himlő vírus kimutatására (Syvänen, Laaksonen és Söderlund 1986, Varveri és mtsi. 1988). A módszer leírását és felhasználhatóságát a következőkben ismertetjük.

### Anyag és módszer

#### *A vírus izolálása és tisztítása*

A szilva himlő vírusának (PPV) a hazai flórából (szilváról) izolált törzsét tiszta kultúrába hoztuk a megfelelő lágyszárú tesztnövények alkalmazásával, majd *Nicotiana clevelandii*-n

szaporítottuk fel, és alapvetően Lain és munkatársai (1988) módszere szerint tisztítottuk. A vírus tüneteit mutató fertőzött növényeket 2–3 héttel az inokulálás után 0,18 M McIlvain's citromsav-foszfát (pH:7) pufferben homogenizáltuk, majd 7500 rpm alacsony fordulátú centrifugálással a szövettörmelékeltávolítottuk. A vírusrészecskéket magasabb fordulatszámú differenciál ultracentrifugálással és ezt követő alacsonyabb fordulatszámú centrifugálás váltogatásával tisztítottuk. A tisztított vírust végül 10–40%-os cukor sűrűséggradiens centrifugálás után kaptuk meg. Hasonló cukor gradiens és detergens kezelés után nyertük a már burokfehérjéjétől megszabadított vírus RNS-t. Az így nyert nagy tisztaságú vírus teljes genomját képező, 10 kilobázis méretű egyszálú RNS-t használtuk fel a molekuláris klónozáshoz.

### A klónozás lépései

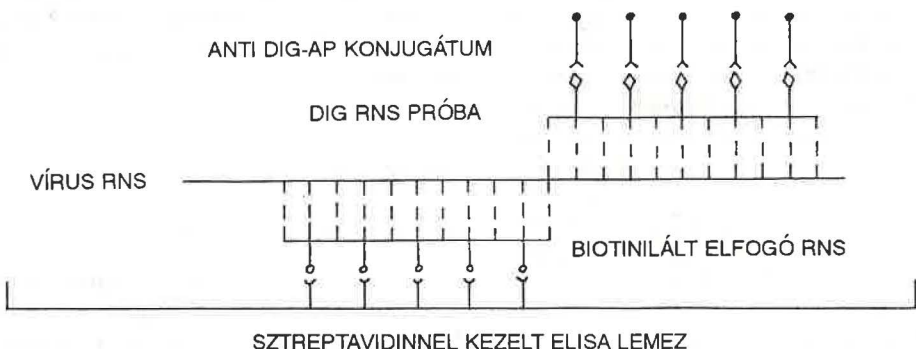
A PPV genomját képező nukleinsav 3' végén egy poliadenilált régió található. Így a komplementer DNS (cDNS) első szálát oligo dT (15 mer) primerrel (kezdő nukleotidokkal) indítottuk. Az első szál cDNS-ét avian myeloblastosis vírus (AMV) reverse transzkriptáz enzimjével szintetizáltattuk. A második szál szintézisét Gubler és Hoffman (1983) munkája alapján végeztük, RNase H és DNS polimeráz I segítségével. Az így kapott kettősszálú (ds) cDNS-t T4 fág DNS polimerázának segítségével „tompá” végűvé alakítottuk át. Az Sma I restrukciós enzimmel linearizált és defoszforilált pUC–18-as klónozó vektorba építettük be a vírusszekvenciát tartalmazó kettősszálú cDNS-t T4 fág DNS ligázának segítségével. Az így létrehozott

rekombináns plazmidot a szokásos transzformációs módszer segítségével (CaCl<sub>2</sub> kezeléssel és 42 °C-os hőssokkal) bejuttattuk JM101-es *Escherichia coli* sejtekbe. Az ampicilint tartalmazó szelektív táptalajon kiválasztottuk azokat a rekombináns klónokat, amelyek vírusspecifikus szekvenciát hordoztak. A diagnosztikum fejlesztésére a klónok közül a pPPV–72-t választottuk ki, amely nukleinsavjának bázissorrendjét meghatároztuk. A pPPV–72-es klón nukleotid sorrendjének meghatározását a dideoxinukleotid láncterminációs módszerrel végeztük el Sanger és munkatársai (1977) nyomán. A szekvenálásnál a Boeringher Mannheim pUC szekvenáló kettősszálú alkalmasztuk a gyártó előírásai szerint. A nukleinsav sorrend adatait GCG version 6.2-es program felhasználásával számítógépen értékeltük ki.

### Eredmények és megvitatásuk

#### A diagnosztikum elvi felépítése

Az elmúlt években elsősorban a humánvirologiában terjedtek el a nukleinsav hibridizáció alapuló diagnosztikumok. Ezek egy része oldatban történő hibridizáció alapul, míg másrésztől szilárd fázison történő hibridizációt alkalmaznak. Az előbbi hatáskörében felülmúlja a rögzített rendszereket. Az általunk alábbiakban részletezett módszer felhasználja az oldatban történő hibridizáció előnyeit, második lépésben rögzíti a kialakult hibrideket a szilárd fázishoz. A szilárd fázis lehet nitrocellulóz membrán vagy a már több, mint egy évtizede széles körben elterjedt ELISA lemez (1. ábra).



1. ábra. A nukleinsav hibridizáció alapuló diagnosztikum elvi felépítése

*A szilva himlő vírus diagnosztikumának kialakítása*

a) A PPV genom beépítése RNS transzkripció vektorba:

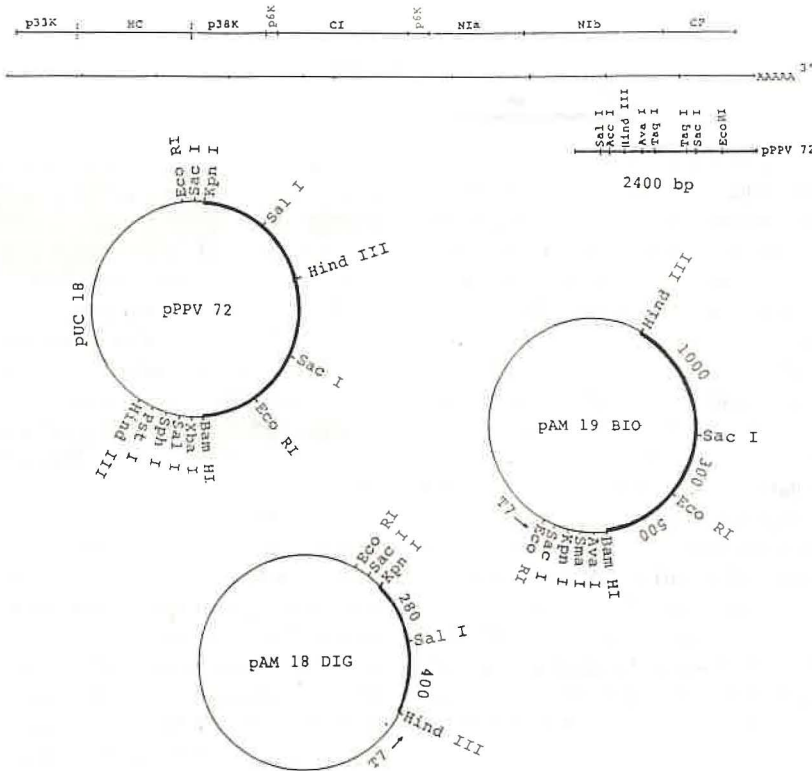
A virális RNS 3' végéről készült 2400 bázispár hosszúságú cDNS-t két részre bontottuk fel és beépítettük pAM18, illetve pAM19 transzkripció plazmidba (2. ábra). Erről a páros promóterű (T7 és SP6-os) RNS transzkripció vektorba szubklónozott két fragmensről szintetizáltattuk az egyik esetben a biotinnal jelölt (elfogó RNS-t), míg a másik esetben a digoxigeninnel jelölt nukleotidok beépítésével a próba RNS-t. A transzkripció elvét foglalja össze a 3. ábra.

b) A vírus RNS detektálásának receptszerű leírása:

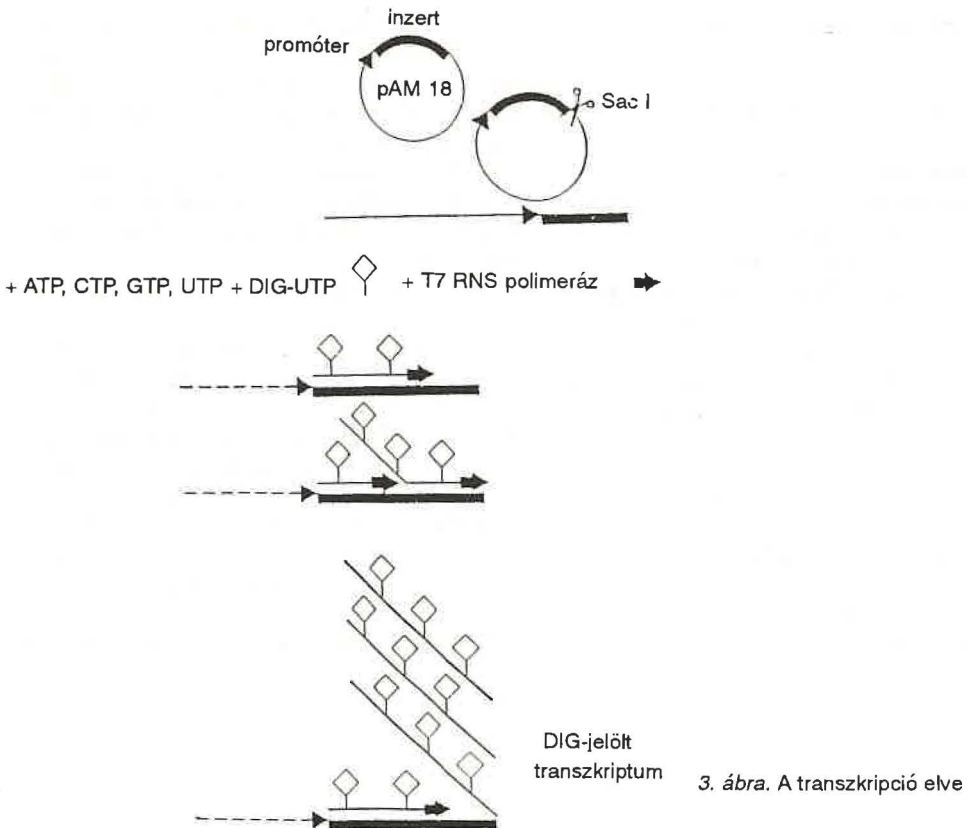
*I. RNS transzkripció;* A 200 µl végtérfogatú reakcióelegy 2 µg Hind III restriktions enzimmel linearizált pAM19 BIO plazmidot, 20 µl 10 x transzkripció puffert, 5 µl humán placenta

ribonukleáz inhibitor (100 u Amersham), 4 µl 25 mM ribonukleotid mixet, 3 µl T7 RNS polimerázt (60 u Amersham) tartalmazott. A reakció 37 °C-on egy óráig történt. A DNS templát elbontása 5 µl RQ 1 DNáz (5 u Promega) jelenlétében történt 37 °C-on, 20 perc alatt. A reakció leállítása után a nukleinsavat fenolkloroformos extrakcióval tisztítottuk, majd alkohollal kicsaptuk.

*II. Fotobiotiniláció;* A szintetizált, kicsapott ribonukleinsavat steril desztillált vízben oldottuk vissza, végkoncentrációját 1 µg/µl-re állítottuk be. Sötétben fotobiotin-acetát oldatot (Bresa) adtunk hozzá azonos térfogatban, majd 15 percig megvilágítottuk a jégbe ágyazott Eppendorf csőben lévő reakcióelegyet 10–15 cm távolságról 1000 W-os Hg-gőz lámpával (HgMI 1000 DI Orion). A reakció elegyet 0,1 M Tris-HCl (pH 9,0) oldattal 100 µl-re egészítettük ki. Azonos térfogatú 2-butanollal összeértük, majd centrifugálással a két fázist elválasztottuk. A felső fázist eltávolítottuk és ezt a butanolos



2. ábra. A PPV genom térképe és a diagnosztikumhoz felhasznált fragmensek szubklónozása



3. ábra. A transzkripció elve

extrakciót megismételtük. Az így megtisztított, jelölt nukleinsavhoz 0,5 térfogat 7,5 M ammónium-acetátot adtunk, majd három térfogat abszolút alkohollal kicsaptuk. A kicsapott nukleinsavat centrifugálással összegyűjtöttük, majd steril vízben oldottuk a biotinilált RNS-t.

**III. Digoxigeninnel jelölt RNS előállítása;** A 100  $\mu$ l végtérfogatú reakcióelegy 1  $\mu$ g Sac I restriktív enzimmel linearizált pAM18 DIG plazmidot, 10  $\mu$ l 10 x transzkripció puffert, 3  $\mu$ l humán placenta ribonukleáz inhibitor (60 u Amersham), 10  $\mu$ l 10 x DIG-ribonukleotid mixet (Boeringer), valamint 2  $\mu$ l T7 RNS polimerázt (40 u Amersham) tartalmazott. A reakció 37 °C-on egy óráig tartott. A DNS templát elbontása 3  $\mu$ l RQ1 DNáz (5 u Promega) jelenlétében 37 °C-on, 20 perc alatt történt. Ezután 100  $\mu$ l 1,5%-os SDS oldatot adtunk a reakcióelegyhez, majd Biogél P-30 (Bio-Rad) oszlopon tisztítottuk. A jelölt RNS koncentrációját megmértük.

**IV. Radioaktív RNS próba előállítása;** Az 50  $\mu$ l végtérfogatú reakcióelegy 1  $\mu$ g Sac I

restriktív enzimmel linearizált pAM18 DIG plazmidot, 5  $\mu$ l 10 x transzkripció puffert, 2  $\mu$ l humán placenta ribonukleáz inhibitor (40 u Amersham), 5  $\mu$ l 5mM-os CTP nélküli ribonukleotid mixet, 5  $\mu$ l 500  $\mu$ M CTP-t 2  $\mu$ l radioaktív CTP-t (0,8 MBq), valamint 2  $\mu$ l T7 RNS polimerázt (40 u Amersham) tartalmazott. A 37 °C-on egy órán át végbement reakció leállítása, a DNS templát elbontása és tisztítása az előző pontban leírtakkal azonos módon történt.

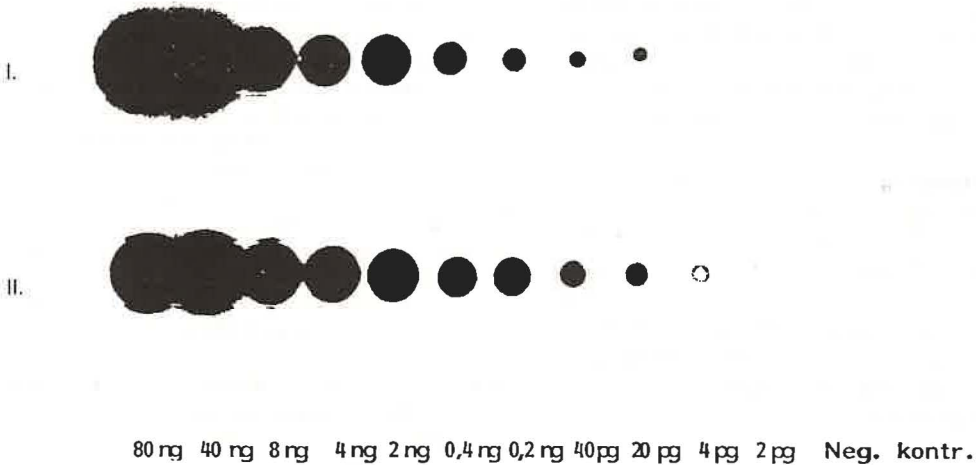
**V. Hibridizáció nylon membránon;** A tisztított vírus RNS-ből desztillált vízzel, illetve 0,5%-os SDS oldattal tízszeresére hígított *Nicotiana clevelandii* szövetnedvvel hígítási sort készítettünk. A membránra (Hybond, Amersham) 1–1  $\mu$ l-t cseppentettünk, majd három percen át UV fényrel az RNS-t a membránhoz kötöttük. A membránt 42 °C-on 10 ml hibridizációs oldatban ráztuk, amely 2,5 ml 20 x SSPE-t, 1 ml 50 x-es Denhardt's oldatot, 0,4 ml élesztő RNS-t (10 mg/ml), 5 ml formamidot és 1,1 ml desztillált vizet tartalmazott. Az előhibridizáció után radioaktív RNS próbát

adtunk az oldathoz (10  $\mu$ l-t, amely 2 millió cpm-nek felelt meg). A radióaktív próba jelenlétében egy éjszakán át rázattuk a membránt, majd 3 x 10 percen át 2 x-es SSC-t és 0,1% SDS-t tartalmazó oldatban mostuk a membránt és autoradiográfiával tettük láthatóvá a hibridizáció eredményét.

**VI. Hibridizáció ELISA lemezen;** Az ELISA lemezeket (Nunc Maxi Sorp) 10  $\mu$ g/ml sztreptavidinnel (Immunoselect) 50 mM Tris-HCl oldatban (pH 7,5) egy éjszakán át 4 °C-on érzékenyítettük. A lemezeket használat előtt 4 x 1 percig 0,05% TWEEN-t tartalmazó PBS oldattal, majd 2 x 1 percig PBS oldattal mostuk. Rezervoáronként 40  $\mu$ l 0,5%-os SDS-sel vagy *Nicotiana clevelandii* szövetnedvvel hígított tisztított szilva himlő vírus RNS-t kevertük össze 80  $\mu$ l hibridizációs oldattal (40 mM Na-foszfát puffer pH 7,0, 4 x SSC, 1 x Denhardt's, 20% deionizált formamid, 2% dextranszulfát, 0,5% SDS, 10  $\mu$ g élesztő RNS, 10<sup>10</sup> molekula biotinilált RNS próba 10<sup>10</sup> molekula digoxigenin jelölt RNS próba). A rezervoárokra 60  $\mu$ l paraffinolajat rétegeztünk, majd a lemezt 60 °C-on négy óra hosszat rázatva inku-

báltuk, majd 37 °C-on két órát rázattuk. A lemezeket az inkubáció után rezervoáronként 200  $\mu$ l 0,1% SSC-t és 0,2% SDS-t tartalmazó oldattal 60 °C-on mostuk, majd 3 x 2 percig 0,05% TWEEN-t tartalmazó PBS oldattal 37 °C-on mostuk. Ezt követően rezervoáronként 120  $\mu$ l 1:1000 hígítású anti-digoxigenin alkalikus foszfatáz konjugátummal inkubáltuk négy órán át 37 °C-on. Az inkubáció után a rezervoárokat az előzőhöz hasonlóan 3 x 2 percig 200–200 ml 0,05% TWEEN-t tartalmazó PBS oldattal mostuk. Rezervoárokba 120  $\mu$ l p-Nitrofenil-foszfát szubsztrátot adtunk (1 tableta 30  $\mu$ l szubsztrát pufferben oldva, Sigma). Az inkubáció egy éjszakán át sötétben, szobahőmérsékleten történt. Az extinkciós értékeket 405 nm-en Labsystem Multiscan Plus ELISA fotométerrel mértük meg.

A szendvicshibridizáció érzékenységét összehasonlítottuk az elérhető legérzékenyebb radioaktív dot-blot hibridizációs módszer érzékenységeivel (4. ábra). Az eredményeink azt mutatják, hogy az új módszer biztonságosan 55 pg vírus RNS-t, vagyis 10<sup>7</sup> vírus RNS molekulát tudott kimutatni, ami megközelíti a



- I. Desztillált vízzel készített vírus RNS hígítási sora
- II. 0,5%-os SDS oldattal tízszeresére hígított *Nicotiana clevelandii* szövetnedvvel készített tisztított vírus RNS hígítási sora

4. ábra Radioaktív dot-blot hibridizáció Hybond membránon

1. táblázat

## Különböző módszerek összehasonlítása a szilva himlő vírus kimutatására

A vizsgált növényfaj	A vizsgált mennyiség (db)	Pozitív eredmények		
		ELISA teszt	Hibridizációs teszt	Radioaktív teszt
Myrobalan	18	0	13	16
Vadőszibarack	11	0	1	8
Mandula	10	0	5	10
Kajszi	1	0	1	1
(db)	40	0	20	35
Összesen				
(%)	100	0	50	87,5

radioaktív vizsgálati módszer határértékét (2 pg vírus RNS) (4. ábra). Az új diagnosztikai eljárás tisztított vírus esetében meghaladta az ELISA módszer irodalomban leírt határértékét (1–2 ng). Öt csonthéjas növényfaj esetében elvégzett összehasonlító vizsgálat eredményei bizonyították az új diagnosztikum fokozott érzékenységét. A nyers nukleinsav kivonatokat meghajtatott rügymintákból készítettük, amelyek üzemi ültetvényekből származtak. Ezeknél a mintáknál egyetlen esetben sem sikerült ELISA teszttel vírusfertőzést kimutatni, míg a radioaktív vizsgálatok 87,5%-os, a szendvicshibridizációs teszt 50%-os fertőzöttséget mutatott (1. táblázat).

Eredményeink jól támasztották alá azt a korábbi megfigyelést, hogy a már széles körben elterjedt ELISA módszer érzékenysége szilva himlő vírus esetében nem elégséges, míg az általunk kidolgozott új diagnosztikai eljárás megközelíti a legérzékenyebb radioaktív eljárás érzékenységét, ezért a szendvicshibridizációs módszer gyakorlati bevezetését mindenképpen indokoltnak tartjuk.

## Köszönetnyilvánítás

Az ismertetett módszer az OMFB támogatásával készült (91–97–07–0113). Az összehasonlító ELISA vizsgálatok magas szintű elvégzéséért és a minták rendelkezésre bocsátásáért

dr. Kölber Mária-nak (Növény- és Talajvédelmi Szolgálat) mondunk köszönetet.

## IRODALOM

- Van Regenmortel, M. H. V. (1981): Serological methods in the identifications and characterization of viruses. In: Comprehensive virology Vol. 17. (Eds. Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.R) Plenum Publishing Corporation p. 183–243
- Jaegle, M. and Van Regenmortel, M. H. V. (1985): Use of ELISA for measuring the extent of serological crossreactivity between plant viruses. Journal of Virological Methods 11: 189–198
- Syvänen, A. C., Laaksonen, M. and Süderlund, H. (1986): Fast quantification of nucleic acid hybrids by affinity based hybrid collection. Nucleic Acids Research 14: 5037–5048
- Varveri, C., Candresse, T., Cugusi, M., Ravelonandro, M. and Dunez, J. (1988): Use of a <sup>32</sup>P-labelled transcribed RNA probe for dot hybridization detection of plum pox virus. Phytopathology 78: 1280–1283
- Lain, S., Riechmann, J., Méndez, E. and García, J.A. (1988): Nucleotide sequence of the 3' terminal region of plum pox potyvirus RNA. Virus Research 10: 325–342
- Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983): A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25: 263–269
- Sänger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with shainterminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A. 74: 5463–5467

## NOVEL METHODS FOR PLUM POX VIRUS DETECTION

L. Palkovics, J. Burgyán and E. Balázs

Agricultural Biotechnology Center,  
H-2101 Szent-Györgyi Albert Street 4. Gödöllő, Hungary

A new non radioactive sandwich hybridization technique was designed to simplify the analysis of large number of plant samples. Plant material was homogenized in 0.5% SDS and added directly to the hybridization reaction, in which a pair of identifying probes was used. One of the probes was biotinylated capture RNA specific for plum pox virus hungarian strain (PPV-SK68), the other RNA probe was synthesized from a plasmid bearing the adjacent sequence of PPV-SK68 and was labelled with digoxigenine. Both purified viral RNA and crude extracts from PPV infected plants were used as a target for sandwich hybridization. The hybridization reaction was carried out in streptavidin coated ELISA plate.

After extensive washing the viral RNA was detected by the conventional color reaction using DIG-AP conjugate (Boehringer). In comparative experiments we have shown that this non radioactive detection system is more sensitive than conventional ELISA technique and we were able to detect virus specific RNA in 50% of ELISA negative samples.

---

A NEMATICID, A REZISZTENS ÉS FOGÉKONY BURGONYAFAJTA  
ÉS AZ UGARSZAKASZ HATÁSA A *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS*  
POPULÁCIÓDINAMIKÁJÁRA SZABADFÖLDI VISZONYOK KÖZÖTT  
SPANYOLORSZÁGBAN

Salazar, A. and Ritter, E.:

Influence of nematicide, resistant and susceptible potato cultivars and bare fallow on the population dynamics of *Globodera rostochiensis* Woll. Rol under field conditions in Spain.

*Annals of Applied Biology*, 1992, 121 (1): 161–166.

A fogékony Desirée és a rezisztens Ciamant fajtákat termesztették kezeletlen és nematicid-kezelésű parcellákon. Vizsgálták a burgonyafonálféreg okozta fertőzöttség mértékét a ciszták és életképes tojások számának meghatározásával kezdetben és a termesztés végeztével. A szaporodás mértékekben élesebben jelentkeztek a különbségek, mint a ciszták és tojások számának alakulásában. A rezisztens fajtánál a nematicides kezelésre nem jelentkezett kimutatható szignifikáns hatás. A fogékony fajtából álló parcellákon sok új cisztát figyeltek meg, függetlenül attól, hogy végeztek-e nematicides kezelést vagy sem. Összességében azonban a fogékony fajtáknál jóval kevesebb cisztát találtak a nematiciddel kezelt állományokban.

Kölcsei Tamás