

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jana MLAKAR

LOKALIZACIJA VIRUSA PVY^{NTN} V RASTLINAH KROMPIRJA

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

LOCALIZATION OF VIRUS PVY^{NTN} IN POTATO PLANTS

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani in na Katedri za botaniko Oddelka za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Majo Ravnikar.

Somentor: dr. Aleš Kladnik

Recenzentka: prof. dr. Marina Dermastia

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

Član: dr. Aleš Kladnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marina Dermastia
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

Datum zagovora: 24.9.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Jana MLAKAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 578.2:633.491(043.2)=163.6
KG rastline krompirja/virus PVY/hibridizacija in situ/lokalizacija virusa
AV MLAKAR, Jana
SA RAVNIKAR, Maja (mentorica)/KLADNIK, Aleš (somentor)/DERMASTIA, Marina (recenzentka)
KZ SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2007
IN LOKALIZACIJA VIRUSA PVY^{NTN} V RASTLINAH KROMPIRJA
TD Diplomska naloga (Univerzitetni študij)
OP XII, 90 str., 6 pregl., 24 sl., 53 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Krompirjev virus Y (PVY) spada v družino *Potyviridae* in na rastlinah krompirja povzroča mozaik, kloroze in nekroze na listih ter odpadanje listov. Večina metod za njegovo detekcijo temelji na detekciji virusnih proteinov ali virusne RNA. Metode za lokalizacijo virusne RNA se uporabljo le redko. Hibridizacija *in situ* omogoča lokalizacijo specifičnih zaporedij nukleinskih kislin v morfološko ohranjenem biološkem materialu. Metodo smo razvili za lokalizacijo RNA virusa PVY^{NTN}, da bi lahko opazovali širjenje in lokacijo virusa v rastlini. V poskusih smo uporabljali rastline *Solanum tuberosum* (L.), sort Igor in Pentland Squire. Pripravili smo sveže tkivne rezine fiksirane v fiksativu Histochoice in parafinske rezine tkiva fiksiranega v fiksativu s formaldehidom, ocetno kislino in alkoholom ali 4% paraformaldehidu. Za hibridizacijo *in situ* smo uporabili oligonukleotidne sonde za RNA plaščnega proteina virusa označene z digoksigeninom ali fluorokromi. Specifično obarvanje smo opazili le v svežih rezinah tkiva hibridiziranega s protismiselnimi sondami označenimi z digoksigeninom. Posamezne vijolično obarvane celice smo opazili na nekaterih rezinah peclja in steba okuženih rastlin. V rezinah kontrolne rastline hibridiziranih s protismiselnno sondijo za RNA plaščnega proteina nismo opazili specifičnega obarvanja, prav tako tudi ne v rezinah hibridiziranih s smiselno ali nesmiselno sondijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.2:633.491(043.2)=163.6
CX potato plants/virus PVY^{NTN}/in situ hybridization/localization of virus
AU MLAKAR, Jana
AA RAVNIKAR, Maja (supervisor)/KLADNIK, Aleš (co-advisor)/DERMASTIA, Marina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2007
TI LOCALIZATION OF VIRUS PVY^{NTN} IN POTATO PLANTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 90 p., 6 tab., 24 fig., 53 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Potato virus Y (PVY) belongs to the family Potyviridae and causes a mosaic pattern, chlorotic and necrotic lesions, vein banding and a leaf-drop effect in potato plants. Most of the methods for its detection are mostly based on detection of its proteins or viral RNA. Methods for localization of its RNA are rarely used. In situ hybridization enables the detection of specific nucleic acid sequences in morphologically preserved biological material and therefore their localization. We developed the method for localization of PVY^{NTN} RNA with this method, so we could observe where it can be found in the plant. For experiment we used plants of *Solanum tuberosum* (L.), cv. Igor and cv. Pentland Squire. We made fresh tissue sections fixed in Histochoice and paraffin sections fixed in formalin-acetic acid-alcohol fixative or 4% paraformaldehyde. For in situ hybridization we used oligonucleotide probes for virus coat protein RNA labeled with digoxigenine or with fluorochromes. We used sections embedded in paraffin or fresh sections. In sections of inoculated plant hybridized with antisense probes we observed single violet colored cells in some sections. In sections of control plant we did not notice specific staining using anti-sense probe for PVY coat protein RNA (CP probe) and also not in sections hybridized with non-sense probes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	1
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KROMPIRJEV VIRUS Y (PVY)	2
2.1.1 Družina <i>Potyviridae</i>	2
2.1.2 Gostitelji virusa PVY	2
2.1.3 Prenos virusa PVY	3
2.1.4 Rezervoarji virusa PVY	3
2.1.5 Fizične in biokemijske značilnosti virusa PVY	3
2.1.6 Citopatologija	3
2.1.7 Različki virusa PVY	4
2.1.8 Različek PVY ^{NTN}	4
2.1.9 Geografska razširjenost virusa PVY	5
2.1.10 Metode za detekcijo in lokalizacijo virusa PVY	5
2.2 HIBRIDIZACIJA <i>IN SITU</i>	7
2.2.1 Sonde	7
2.2.1.1 DNA sonde	7
2.2.1.2 RNA sonde	8
2.2.1.3 Oligonukleotidne sonde	8
2.2.1.4 Začetni oligonukleotidi za PCR	8
2.2.2 Označevanje sond	9
2.2.2.1 Neposredno označevanje	9
2.2.2.1.1 Radioaktivno označevanje	9
2.2.2.1.2 Označevanje s fluorokromi	9
2.2.2.2 Posredno označevanje	10
2.2.2.2.1 Označevanje z digoksigeninom	10
2.2.2.2.2 Označevanje z biotinom	11
2.2.3 Izvedba hibridizacije <i>in situ</i>	11
2.2.3.1 Priprava raztopin in posode	11
2.2.3.2 Fiksacija tkiva	11
2.2.3.3 Priprava tkivnih rezin	12
2.2.3.3.1 Vklapljanje vzorcev tkiva in rezanje rezin	12
2.2.3.3.2 Permeabilizacija s proteazami	13
2.2.3.3.3 Alternativna fiksacija in rezanje svežih rezin	13
2.2.3.4 Hibridizacija <i>in situ</i>	14
2.2.3.4.1 Acetilacija	14
2.2.3.4.2 Predhibridizacija	14
2.2.3.4.3 Hibridizacija	14

2.2.3.4.4 Posthibridizacijska spiranja	15
2.2.3.5 Detekcija hibridiziranih mest.....	16
2.2.3.5.1 Detekcija protiteles konjugiranih z encimi	16
2.2.3.5.1.1 Alkalna fosfataza	17
2.2.3.5.1.2 Hrenova peroksidaza	17
2.2.3.5.2 Pomnožitev signala s tiramidnim sistemom	17
2.2.3.6 Kontrole	18
2.2.3.7 Mikroskopija.....	19
2.2.3.7.1 Svetlobna presevna mikroskopija	19
2.2.3.7.2 Fluorescenčna mikroskopija.....	19
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 Priprava raztopin	20
3.1.1 Priprava raztopin za sterilizacijo posode:.....	20
3.1.2 Priprava raztopin za hibridizacijo:	20
3.1.3 Priprava raztopin potrebnih za okuževanje rastlin:	22
3.1.4 Priprava fiksativov:.....	23
3.1.5 Lovljenje virusnih delcev na protitelesa	23
3.1.6 Hibridizacija točkovnega odtisa	25
3.1.6.1 Hibridizacija točkovnega odtisa I, II, III	25
3.1.6.2 Hibridizacija točkovnega odtisa IV, V, VI, VII	26
3.1.7 Hibridizacija <i>in situ</i>	28
3.2 Metode	32
3.2.1 Priprava posode	32
3.2.2 Okuževanje rastlin krompirja sorte Igor s PVY ^{NTN}	33
3.2.3 Fiksacija rastlinskega materiala v 4% PF in FAA	33
3.2.4 Dehidracija	33
3.2.5 Vklapljanje v bloke.....	34
3.2.6 Rezanje rezin na mikrotomu	34
3.2.7 Načrtovanje oligonukleotidnih sond	34
3.2.7.1 Fluorescentno označene sonde	34
3.2.7.2 Z digoksigeninom označene sonde	35
3.2.8 Lovljenje virusnih delcev na protitelesa	38
3.2.9 RT-PCR v realnem času	39
3.2.10 Hibridizacija točkovnega odtisa	40
3.2.10.1 Hibridizacija točkovnega odtisa I:	40
3.2.10.2 Hibridizacija točkovnega odtisa II.....	41
3.2.10.3 Hibridizacija točkovnega odtisa III	41
3.2.10.4 Koncentriranje virusne RNA:	42
3.2.10.4.1 Koncentriranje I	42
3.2.10.4.2 Koncentriranje II.....	43
3.2.10.4.3 Koncentriranje III	43
3.2.10.5 Hibridizacija točkovnega odtisa IV	43
3.2.10.6 Hibridizacija točkovnega odtisa V	44
3.2.10.7 Hibridizacija točkovnega odtisa VI	44
3.2.10.8 Hibridizacija točkovnega odtisa VII oz odtis tkiva:	45
3.2.11 Hibridizacija <i>in situ</i>	45
3.2.11.1 Test delne razgradnje rezin s pronazo E	45

3.2.11.2 Hibridizacija s fluorescentnimi sondami	46
3.2.11.2.1 Hibridizacija <i>in situ</i> na parafinskih rezinah s fluorescentno označenimi sondami	46
3.2.11.2.2 Hibridizacija <i>in situ</i> na svežih rezinah s fluorescentno označenimi sondami	47
3.2.11.2.3 Poskus odprave avtofluorescence.....	47
3.2.11.2.3.1 Barvanje s kristal vijoličnim.....	48
3.2.11.2.3.2 Glicin in NaBH ₄	48
3.2.11.3 Hibridizacija z digoksigeninom označenimi sondami.....	48
3.2.11.3.1 Hibridizacija <i>in situ</i> na parafinskih rezinah s sondami označenimi z digoksigeninom	48
3.2.11.3.2 Hibridizacija <i>in situ</i> z uporabo tiramidnega sistema za ojačanje signala	50
3.2.11.3.3 Hibridizacija <i>in situ</i> na svežih rezinah s sondami označenimi z digoksigeninom	51
4 REZULTATI.....	52
4.1 Okuževanje rastlin krompirja sorte Igor s PVY ^{NTN}	52
4.2 Izolacija virusnih delcev in odpiranje plaščnih proteinov virusa PVY	54
4.3 Test sond – hibridizacija točkovnega odtisa.....	56
4.4 Hibridizacija virusne RNA <i>in situ</i>	62
4.4.1 Hibridizacija <i>in situ</i> na svežih rezinah s fluorescentno označenimi sondami	62
4.4.2 Hibridizacija <i>in situ</i> na parafinskih rezinah s fluorescentno označenimi sondami	64
4.4.2.1 Test razgradnje tkivnih rezin s pronazo E	64
4.4.2.2 Hibridizacija	65
4.4.2.3 Poskus utišanja avtofluorescence	67
4.4.3 Hibridizacija <i>in situ</i> na parafinskih rezinah s sondami označenimi z digoksigeninom	70
4.4.4 Hibridizacija <i>in situ</i> z uporabo tiramidnega sistema za ojačanje signala	71
4.4.5 Hibridizacija <i>in situ</i> na svežih rezinah s sondami označenimi z digoksigeninom	72
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	75
5.1 Razprava	75
5.2 Sklepi	81
6 POVZETEK (SUMMARY)	83
7 VIRI	85
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Molekula digoksigenina (Roche Applied Science, 2002/2003, str. 12)	10
Slika 2: Shematski prikaz uporabljenih metod	32
Slika 3: Ekscitacijske valovne dolžine fluorescentno označene sonde	35
Slika 4: Nukleotidno zaporedje za plaščni protein virusa PVY (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=14573282). Z barvami so pobravana vezavna mesta protismiselnih sond: rumena-vezavno mesto sonde P1 (sivo - odstopanje v enem nukleotidu), zelena- vezavno mesto sonde P2, modra vezavno mesto sonde P3, roza- vezavno mesto sonde P4.....	36
Slika 5: Najbolj verjetna struktura oligonukleotidnih sond za virus PVY pri 50 °C dobljena v programu MFOLD (Zuker, 2003 in Walter in sod., 1994; http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1-2.3.cgi)	36
Slika 6: Postopek lovljenja virusnih delcev na protitelesa in odpiranje plaščnega proteina; na enak način smo obdelali vzorce okuženih in neokuženih rastlin.....	38
Slika 7: Mozaični vzorec na rastlini krompirja sorte Igor iz rastlinjaka okužene z rastlinskim sokom rastline krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture okužene z virusom PVY ^{NTN}	54
Slika 8: Preverjanje prisotnosti virusne RNA v vzorcih z gelsko elektroforezo: (1) 37 °C, PVY+, obdelan s proteinazo K, brez dodanega SDS; (2) 37 °C, PVY+, obdelan s pronazo E; (3) sobna temperatura, PVY+, obdelan s pronazo E; (4) 70 °C, PVY +; (5) 37 °C, PVY-, obdelan s proteazo E; (6) velikostni standard (1 kb Ladder, MBI Fermantas).	57
Slika 9: Hibridizacija točkovnega odtisa čez noč in 3 dnevni inkubaciji v substratni raztopini: (1) 37 °C, PVY+, obdelan s proteinazo K, brez dodanega SDS; (2) 37 °C, PVY+, obdelan s pronazo E; (3) sobna temperatura, PVY+, obdelan s pronazo E; (4) sobna temperatura, PVY-, obdelan s proteazo E; (5) DEPC voda	57
Slika 10 Uspešnost koncentriranja virusne RNA v vzorcih smo preverili z elektroforezo: (1) 37 °C, PVY+, obdelan s pronazo E, precipitiran; (2) 37 °C, PVY+, obdelan s pronazo E, neprecipitiran; (3) skoncentriran vzorec po RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup iz Rneasy Mini Handbook (06/2001); (4) velikostni standard (1 kb Ladder, MBI Fermentas).	58
Slika 11: Hibridizacija točkovnega odtisa IV: (1) DEPC voda; (2) skoncentriran vzorec s koncentriranjem III (glej Metode); (3) celokupna RNA izolirano iz okuženih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy; (4) celokupna RNA izolirano iz zdravih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy; (5) DEPC voda.....	58
Slika 12: Hibridizacija točkovnega odtisa V z vsako sondi posebej: (1) skoncentriran vzorec s koncentriranjem III; (2) celokupna RNA izolirana iz okuženih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy; (3) celokupna RNA izolirana iz zdravih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy; (4) DEPC voda.....	60
Slika 13: Hibridizacija točkovnega odtisa VI: celokupna RNA izolirana iz zdravih rastlin krompirja sorte Pentland Squire (1) in sorte Sante (2) ter okuženih (3) rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture s kitom RNeasy; svež rastlinski sok iz zdravih (4) in okuženih (5) rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture; svež rastlinski sok iz zdravih (6) in okuženih (7) rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture obdelan s pronazo E; (8) DEPC voda.	61

Slika 14: Hibridizacija točkovnega odtisa VII oz. odtis tkiva (prečni prerez stebla, vzdolžni prerez stebla in prečni prerez peclja) na membrano: odtis tkiva neokužene (1) in okužene (2) rastline; celokupna RNA izolirana iz neokuženih (3) in okuženih (4) rastlin s kitom RNeasy ; (5) DEPC voda; odtis tkiva neokužene (6) in okužene (7) obdelan s pronazo E. Ves rastlinski material je bil iz rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture.	62
Slika 15: Hibridizacija <i>in situ</i> na svežih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire s fluorescentnimi sondami: Prvi in drugi stolpec prikazujeta preparate lista, peclja in stebla neokuženih rastlin krompirja fiksirane v FAA ali 4% PF opazovane z modro (450-490 nm) in zeleno (546 nm) ekscitacijsko svetlobo, medtem ko tretji in četrti stolpec prikazujeta preparate okuženih rastlin krompirja.....	63
Slika 16: Test delovanja pronaze E pri različnih pogojih, tkivo fiksirano v FAA: Prvi in drugi stolpec prikazujeta preparate lista obdelane 15 ali 30 min za različnimi koncentracijami (125, 500, 1000 µg/ml) pronaze E pri različnih temperaturah (TS - sobna temperatura, 37 °C). Tretji in četrti stolpec prikazujeta preparate vzdolžnega prereza stebla obdelane na enak način.....	65
Slika 17: Hibridizacija <i>in situ</i> na tkivnih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire fiksiranih v FAA in vklopljenih v vosek, s fluorescentnimi sondami: Prvi stolpec prikazuje preparate lista in stebla s pecljem neokuženih rastlin krompirja fiksirane v FAA opazovane z modro (450-490 nm) eksitacijsko svetlobo hibridizirane s sondom ali brez, medtem ko drugi stolpec prikazuje preparate okuženih rastlin krompirja. ...	66
Slika 18: Poskus utišanja avtofluorescence na tkivnih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire fiksiranih v FAA in vklopljenih v vosek, s fluorescentnimi sondami: Prvi stolpec prikazuje preparate stebla s pecljem neokuženih rastlin krompirja fiksirane v FAA obdelane s 0,1% kristal vijoličnim, opazovane z modro (450-490 nm) eksitacijsko svetlobo. Drugi stolpec prikazuje iste preparate opazovane z zeleno (546 nm) eksitacijsko svetlobo.....	68
Slika 19: Poskus utišanja avtofluorescence na tkivnih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire fiksiranih v FAA in vklopljenih v vosek, z natrijevim borohidridom (NaBH ₄) in glicinom: Prvi stolpec prikazuje preparate stebla s pecljem neokuženih rastlin krompirja fiksirane v FAA obdelane z ali brez natrijevega borohidrida in dodanim glicinom, opazovane z modro (450-490 nm) eksitacijsko svetlobo. Drugi stolpec prikazuje iste preparate opazovane pod zeleno (546 nm) eksitacijsko svetlobo.....	69
Slika 20: Hibridizacija <i>in situ</i> na rezinah rastlin krompirja sorte Igor iz rastlinjaka s sondami označenimi z digoksigeninom: Prvi in drugi stolpec prikazujeta preparate listnega peclja neokuženih rastlin krompirja fiksiranih v FAA z uporabo različnih sond navedenih v spodnjem desnem kotu vsake slike, medtem ko tretji in četrti stolpec prikazujeta preparate okuženih rastlin.....	70
Slika 21: Temne celice na rezini okužene rastline krompirja sorte Igor iz tkivne kulture fiksirane v FAA, vklopljene v vosek in inkubirane z NBT/BCIP, brez hibridizacije <i>in situ</i>	71
Slika 22: Slika svežih prečnih in vzdolžnih rezin tkiva stebla in peclja rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture. Na levi sliki so prerezi neokužene, na desni pa okužene rastline.	71
Slika 23: Hibridizacija <i>in situ</i> na svežih rezinah rastlin krompirja sorte Igor iz rastlinjaka fiksiranih v fiksativu Histochoice. Prvi in drugi stolpec prikazujeta preparate lista,	

peclja in stebla neokuženih rastlin z uporabo različnih sond navedenih v spodnjem desnem kotu vsake slike, medtem ko tretji in četrti stolpec prikazujeta preparate okuženih rastlin krompirja. Uporabili smo štiri protismiselne oligonukleotidne sonde (P1-P4) in nesmiselno sondno (LS), označene z digoksigeninom in detekcijo z NBT/BCIP. Puščice označujejo specifično obarvanje celic..... 74
Slika 24: Hibridizacija *in situ* na svežih rezinah rastlin krompirja sorte Igor iz rastlinjaka fiksiranih v fiksativu Histochoice. Slika prikazujeta preparat peclja okuže rastline krompirja. Puščice označujejo specifično obarvanje celic. 74

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: pH vrednosti raztopin Tris-HCl.....	22
Preglednica 2: Priprava etanolne vrste (40 ml).	22
Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja uporabljenih sond označenih z digokigeninom in njihove lastnosti.....	37
Preglednica 4: Opis bolezenskih znamenj in znakov ranitve in staranja rastlin krompirja sorte Igor 5 dni po okužbi: mlade rastline (na dan okuževanja stare 28 dni), stare rastline (na dan okuževanja stare 37 dni); okužene (rastline krompirja sorte Igor okužene z rastlinskim sokom rastline krompirja sorte Pentland Squire okužene z virusom PVY ^{NTN}); slepe (rastline krompirja sorte Igor inokulirane z rastlinskim sokom zdrave rastline krompirja sorte Pentland Squire); zdrave (neobdelane rastline krompirja sorte Igor).....	52
Preglednica 5: Opis bolezenskih znamenj in znakov ranitve in staranja rastlin krompirja sorte Igor 12 dni po okužbi: mlade rastline (na dan okuževanja stare 28 dni), stare rastline (na dan okuževanja stare 37 dni); okužene (rastline krompirja sorte Igor okužene z rastlinskim sokom rastline krompirja sorte Pentland Squire okužene z virusom PVY ^{NTN}); slepe (rastline krompirja sorte Igor inokulirane z rastlinskim sokom zdrave rastline krompirja sorte Pentland Squire); zdrave (neobdelane rastline krompirja sorte Igor).....	53
Preglednica 6: Rezultati RT-PCR v realnem času (kit Brilliant QPCR Core Reagent kit, Stratagene).....	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AP	alkalna fosfataza
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat
BSA	goveji serumski albumin
DAB	diaminobenzidin
DEPC	dietilpirokarbonat
dH ₂ O	destilirana voda
DIG	digoksigenin
DIG-NHS	digoksigenin-3-O-sukcinil-e-aminokapročna kislina-N-hidroksisukcinimid ester
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
EDTA	etilendiamin tetraacetat
ELISA	encimskoimunski test
EtBr	etidijev bromid
EtOH	etanol
FAA	fiksativ s formaldehidom, ocetno kislino in alkoholom
FAM	karboksifluorescein
GFP	zeleni fluorescentni protein
mRNA	informacijska RNA
NBT	4-nitroblue tetrazolijev klorid
PBS	fosfatni pufer s soljo
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PF	paraformaldehid
PVP	polivinil pirolidon
PVY	krompirjev virus Y
PVY-	ni okuženo z virusom PVY
PVY+	okuženo z virusom PVY
RNA	ribonukleinska kislina
RNaza	ribonukleaza
RT-PCR	reakcija PCR z reverzno transkripcijo
SDS	natrijev dodecilsulfat
SSC	pufer z natrijevim kloridom in natrijevim citratom
TS	sobna temperatura
TAE	tris acetatni pufer
TAMRA	tetrametilrodamin
TBA	terciarni butilni alkohol
TE	TrisHCl pufer z dodatkom EDTA
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
UTP	uracil trifosfat

1 UVOD

Zasledovanje virusne okužbe v rastlinah je možno na različne načine, od seroloških metod, elektronske mikroskopije do različnih tehnik molekularne biologije. Elektronska mikroskopija v kombinaciji z imunolokalizacijo nam omogoča vpogled v nahajanje virusov v posameznih celicah, ni pa najprimernejša za bolj celovit pregled širjenja virusa po tkivih. Za nekatere viruse, kot so na primer potivirusi je znano, da se njihove nukleinske kisline uspešno premikajo po rastlini, tudi če niso enkapsulirane v virusni proteinski plič. Hibridizacija *in situ* nam omogoča sledenje virusnih nukleinskih kislin v tej obliki in tudi kompletnih virusnih delcev.

Predvidevali smo, da bomo z metodo hibridizacije *in situ* uspešno lokalizirati virus PVY v tkivnih rezinah krompirja okuženih z virusom, ugotovili kje v tkivu se virus nahaja in posledično opazovali njegovo širjenje po okužbi. S tem bomo dopolnili druge metode za zasledovanje prisotnosti in premikanja virusov v rastlinah.

Namen:

- ugotoviti najboljšo metodo za odstranitev virusnih proteinov, da bi dobili proste virusne nukleinske kisline
- optimizirati postopek hibridizacije *in situ*
- ugotoviti, če je lokalizacija virusa mogoča na svežih rezinah
- lokalizirati virus v tkivnih rezinah okuženih rastlin krompirja (steblo, peclji, listi)
- z metodo hibridizacije *in situ* dopolniti druge metode za zasledovanje prisotnosti in premikanja virusov v rastlinah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIRJEV VIRUS Y (PVY)

Krompir napadajo številni škodljivci in mnogi glivični, bakterijski in virusni povzročitelji bolezni. Ker se krompir vegetativno razmnožuje, virusi pa prenašajo z gomolji krompirja, predstavljajo le ti trajno grožnjo za kmetovalce (Glais in sod., 2005). Med virusi je PVY eden izmed ekonomsko najpomembnejših rastlinskih virusov (Shukla in sod., 1994, cit. po Glais in sod., 2005), ki je zelo razširjen in odgovoren za upad količine in kvalitete pridelka (Beemster in de Bokx, 1987, cit. po Glais in sod., 2005). Prvič ga je našel Smith leta 1931 pri krompirju v Veliki Britaniji (Brunt in sod., 1996).

2.1.1 Družina *Potyviridae*

Virus PVY uvrščamo v rod *Potyvirus* (Brunt, 1992; Hall in sod., 1998, cit. po Glais in sod., 2005; Fauquet in sod., 2005) in v družino *Potyviridae* (Winterhalter, 2003; Fauquet in sod., 2005). Družina *Potyviridae* je največja in ekonomsko najpomembnejša skupina rastlinskih virusov med sedaj znanimi 34 družinami virusov (Singh M in Singh RP, 1995). Družina združuje 180 virusov (30% vseh znanih rastlinskih virusov), ki povzročajo škodo na kmetijskih, pašnih, okrasnih rastlinah in vrtninah (Ward in Shukla, 1991).

Po strukturi genoma in načinu ekspresije so podobni rastlinskim komo- in nepovirusom in živalskim pikornavirusom. Njihov genom ima evolucijsko ohranjeno zaporedje, ki kodira nestrukturne proteine, ki sodelujejo v podvojevanju RNA. Vse te skupine virusov so združili v superskupino pikorna-podobnih virusov (Goldbach, 1986, 1987; Goldbach in sod., 1990, cit. po Winterhalter, 2003).

Virioni potivirusov so brez ovojnici (Langenberg in Zhang, 1997, cit. po Winterhalter, 2003), filamentozni, dolgi 650-900 nm in široki 11-15 nm (Dougherty in Carrington, 1988 cit. po Winterhalter, 2003; Riechmann in sod., 1992; Fauquet in sod., 2005). Njihov genom je pozitivno usmerjena enoverižna RNA, dolga 9,3-10,8 kb, ki jo obdaja približno 2000 molekul plaščnega proteina (Martin in Gelie, 1997, cit. po Winterhalter, 2003; Fauquet in sod., 2005). Pozitivno usmerjena veriga deluje kot mRNA in ima 5' nekodirajočo regijo, ki deluje kot pospeševalec translacije (Carrington in Freed, 1990).

2.1.2 Gostitelji virusa PVY

Naravni gostitelji virusa so krompir (*Solanum tuberosum*) (Beemster in Rozendaal, 1972, cit. po Brunt in sod., 1996), paprika (*Capsicum annuum*), tobak (*Nicotiana tabacum*) in

paradižnik (*Lycopersicon esculentum*), pri katerih povzroča različna bolezenska znamenja (Edwardson, 1974, cit. po Brunt in sod., 1996). Za virus so dovezne še nekatere druge rastlinske vrste iz družin *Chenopodiaceae*, *Commelinaceae* in *Solanaceae* (Brunt in sod., 1996; Fauquet in sod., 2005).

Nekatere sorte krompirja, npr. Igor so zelo občutljive za okužbo z virusom PVY, medtem ko so druge, npr. Désirée in Pentland squire, bolj tolerantne. Redke sorte krompirja, kot je npr. Sante, so popolnoma odporne proti virusu (Kus, 1995).

2.1.3 Prenos virusa PVY

Virus PVY prenašajo žuželke kot npr. *Myzus persicae* (najbolj učinkovit), *Aphis fabae*, *Macrosiphum euphoriae*, *Myzus (Nectarosiphon) certus*, *Myzus (Phorodon) humuli* in *Rhopalosiphum insertum* (Kennedy in sod., 1962, cit. po Brunt in sod., 1996; Van Hoof, 1980, cit. po Brunt in sod., 1996; Fauquet in sod., 2005). Za vektorski prenos ne potrebuje pomožnega virusa, pomaga pa lahko pri vektorskem prenosu drugega virusa. Prenaša se z mehansko inokulacijo. Prenos je mogoč tudi pri cepljenju (Brunt in sod., 1996; Fauquet in sod., 2005).

2.1.4 Rezervoarji virusa PVY

V zmernem podnebju so trajnice redko rezervoarji virusa. Krompir je podzemni rezervoar virusa (Thresh, 1980, cit. po Brunt in sod., 1996). V tropih in subtropih je plevel, kot je npr. *Solanum atropurpureum* (Chagas in sod., 1977, cit. po Brunt in sod., 1996), pomemben rezervoar virusa.

2.1.5 Fizične in biokemijske značilnosti virusa PVY

Virioni so filamentozni, brez ovojnici, običajno gibljivi, dolgi 680-900 nm in široki 11-13 nm (Varma in sod., 1968, cit. po Brunt in sod., 1996; Fauquet in sod., 2005). Virioni vsebujejo 5,4-6,4% nukleinskih kislin (Stace-Smith in Tremaine, 1970, cit. po Brunt in sod., 1996; Leiser in Richter, 1978, cit. po Brunt in sod., 1996), 93,6-94,6% proteinov in 0% maščob. Genom je sestavljen iz linearne enoverižne RNA in je velik 9,7 kb (Fauquet in sod., 2005).

2.1.6 Citopatologija

Virione virusa PVY je opaziti v povrhnjici v citoplazmi in celičnih vakuolah. V okuženih celicah so prisotni vključki kot kristali v jedru (pri nekaterih različkih virusa) (Kitajima in sod., 1968 cit. po Brunt in sod., 1996; Fauquet in sod., 2005) ali kot vetrnice v tkivu povrhnjice in citoplazmi (Christie in Edwardson, 1977, cit. po Brunt in sod., 1996).

Mitohondriji v celicah, okuženih z različkom Y^N, so obdani s filamenti premera 9-10 nm in nedoločene dolžine (Borges in David Ferreira, 1968, cit. po Brunt in sod., 1996).

2.1.7 Različki virusa PVY

Glede na gostitelja so virus PVY sprva razdelili na štiri linije (krompirjeva, paprikina, tobakova in paradižnikova). Sedanja razdelitev virusov temelji na bolezenskih znamenjih in oblikah odpornosti rastlin proti virusu. Tako ločimo tri različke, in sicer: PVY^N, PVY^O in PVY^C (De Bokx in Huttinga, 1981). Ločijo se po lokalnih in sistemskih bolezenskih znamenjih, ki jih povzročijo na tobaku (*Nicotiana tabacum*) in krompirju (*Solanum tuberosum*). Izolati, ki spadajo med PVY^N, povzročijo nekrozo žil na listih tobaka (*N. tabacum cv. Xanthi*) in zelo šibko lisavost z redkimi nekrozami na listih rastlin krompirja. PVY^O virusi povzročijo lisavost in mozaik pri tobaku in mozaik na listih ter odpadanje listov krompirja. PVY^C povzročijo bolezenska znamenja pikčastih črt (»stipple streak«) pri nekaterih sortah krompirja (Jacquot, 2005).

Tako je PVY^O odgovoren za 40-70% izgubo pridelka krompirja po okužbi (Van der Zagg, 1987, cit. po Jacquot, 2005) in PVY za 14-59% pridelka tobaka (Latore in sod., 1984, cit. po Jacquot, 2005). Izguba pridelka lahko naraste do 100% v primeru nekroze žil pri tobaku okuženem s PVY^N (Jacquot, 2005).

2.1.8 Različek PVY^{NTN}

Med vsemi različki virusa je PVY^{NTN} najbolj agresiven. Večina sort krompirja je dovetnih za virus PVY^{NTN} in razvije raznolika bolezenska znamenja po okužbi. Pri občutljivih sortah povzroči PVY^{NTN} obročkasto nekrozo gomoljev krompirja, kar pomembno zmanjša količino in kvaliteto pridelka. Zaradi pomembnosti krompirja kot vrtnine in epidemične razširitve tega virusa v Evropi in drugih kontinentih od 1980 naprej, so preučili mnoge fiziološke in morfološke parametre (Pompe-Novak in sod., 2006).

Najbolj občutljiva in dovetna sorta krompirja za virus PVY^{NTN} je Igor, pri kateri je bolezenska znamenja opaziti tako na gomoljih kot tudi na zelenih delih okuženih rastlin. Nekaj dni po okužbi se nekrotične pike, gube in mozaične kloroze pojavijo na inokuliranih listih. Na neinokuliranih listih se pojavijo, ko se virus razširi. Listi začnejo odpadati tako po primarni, kot tudi po sekundarni okužbi (Kus, 1995). Razlike je opaziti tudi na celični ravni. V nekrotičnih pikah pri krompirju sorte Igor nabreknejo kloroplasti, tilakoide se zrahljajo in spremeni se optična gostota kloroplastov, v okolini pik pa je opaziti le spremembe v velikosti kloroplastov (Pompe-Novak in sod., 2006). Poleg tega je na mestu lokalnih poškodb opaziti manjšo količino klorofila. Hkrati se poveča aktivnost topnih in ionsko vezanih peroksidaz (Milavec in sod., 2001). Poleg tega je opaziti spremembe v

izražanju proteinov (Gruden in sod., 2000). Manjša je tudi količina citokinov, ki spodbujajo razvoj kloroplastov (Dermastia in sod., 1995).

2.1.9 Geografska razširjenost virusa PVY

Razširjen je po celi svetu v krajih, kjer gojijo krompir in v toplejših krajih, kjer zunaj gojijo papriko, tobak in paradižnik. PVY^O je razširjen po celi svetu, PVY^N se pojavlja v Evropi, delih Afrike in Južne Amerike, PVY^C pa je prisoten v Avstraliji, Indiji in ponekod v Veliki Britaniji in kontinentalni Evropi (Brunt in sod., 1996).

2.1.10 Metode za detekcijo in lokalizacijo virusa PVY

Interakcija med rastlinami in mikrobi je dinamičen proces. Zaželene so tehnike, ki omogočajo sočasno detekcijo prisotnosti mikroba ali sintezo obrambnih dejavnikov rastline in vizualizacijo njegove razporeditve v obolelem tkivu (Krzymowska in Hennig, 1997).

Uporabiti je mogoče različne metode za spremljanje gibanja virusa po rastlini. Najbolj preprosta vključuje zapisovanje zaporedja pojavljanja bolezenskih znamenj na inokuliranih listih in na celotni rastlini. Če se pojavijo sistemski bolezenski znamenji, je jasno, da se je virus razširil iz inokuliranih listov v ostale dele rastline. Ta metoda pa ni uporabna pri tolerantnih rastlinah. V tem primeru je potrebno uporabiti bolj specifične metode zaznavanja virusnih proteinov ali nukleinskih kislin ter opazovanje virusnih delcev pod elektronskim mikroskopom (Mehle in sod., 2004).

Metode za lokalizacijo virusov v točno določenih delih rastline vključujejo serološke metode (neposredna in posredna ELISA, odtis tkiva na membrani, imunolokalizacija z elektronsko mikroskopijo), novejše molekulske metode (hibridizacija, PCR, RT-PCR, RT-PCR-ELISA (Chandelier in sod., 2001, cit. po Mehle in sod., 2004), PCR v realnem času (Mackay in sod., 2002), mikromreže in genske čipe (Boonham in sod., 2003, cit. po Mehle in sod., 2004)).

Poročevalski geni, kot je npr. gen za β -glukuronidazo (Dolja in sod., 1994) ali GFP (zeleni fluorescentni protein) (Murphy in sod., 2002; Wang in sod., 1999), se lahko vgradijo v mutiran virusni genom in omogočajo spremljanje okužbe z detekcijo produkta poročevalskega gena. Ta možnost je uporabna le, če prisotnost vgrajenega gena ne vpliva na virusno okužbo (Seron in Haenni, 1996).

ELISA in imunski test Western obsegata standardne diagnostične tehnike, ki se uporabljajo v presejalnih tehnikah PVY. Njuna uporaba pa je omejena, saj sta usmerjena le na zaznavanje prisotnosti virusa in ne njegove razporeditve. Z imunocitokemijo, elektronsko

mikroskopijo in hibridizacijo *in situ* lahko zelo natančno določimo lokacijo DNA, RNA, proteinov in virusnih delcev v rastlinskem tkivu (Krzymowska in Hennig, 1997).

Hibridizacija nukleinskih kislin je občutljiva in zanesljiva metodo za lokalizacijo rastlinskih virusov (Hsu in sod., 2000). Nikolič, 2006 je je dokazala, da je hibridizacija *in situ* zelo primerna za lokalizacijo RNA na ravni tkiva. Z metodo hibridizacije *in situ* so Mielke in sod. (2006) uspešno lokalizirali tip bunjavirusne RNA. Tudi Mortimer-Jones in sod. (2007) in Rajamäki in Valkonen (2002) so poskušali lokalizirati različne krompirjeve virusne z metodo hibridizacije *in situ*. Slednja avtorja sta ugotovila, da je hibridizacija *in situ* za detekcijo virusa PVA bolj občutljiva od imunocitokemične detekcije.

2.2 HIBRIDIZACIJA *IN SITU*

Hibridizacijo *in situ* so razvili Padue in Gall (1969) in neodvisno še John s sodelavci (1969; cit. po Roche Applied Science, 2002/2003). Hibridizacija temelji na označenih zaporedjih nukleinskih kislin primerne dolžine (sondah), ki se z vodikovimi vezmi povežejo s komplementarnim zaporedjem DNA ali RNA v tkivu ali celici. S tem lahko natančno zaznamo lokacijo zaporedja DNA ali RNA v različnih tkivih in celičnih tipih (Montgomery, 2002). DNA hibridizacija *in situ* nam da informacijo o organizaciji, lokaciji kromosomov, razporeditvi genoma, številu kopij, evolucijskih spremembah in mešanju z drugimi zaporedji. RNA hibridizacija pa nam da informacije o lokaciji in o stopnji ekspresije določenih genov v tkivih, celicah, celičnih organelih (Ruzin, 1999). Z metodo hibridizacije *in situ* lahko zaznamo tako pozitivno, kot tudi negativno verigo virusa (Webster in sod., 2004).

Metoda je podobna prenosu northern in prenosu po Southernu, le da se izvaja na tkivnih rezinah in ne na membranah. Hibridizacija *in situ* je metoda visoke ločljivosti, saj se pri drugih metodah struktura celic in tkiva ne ohrani ali pa je mogoče opazovati le anatomske detajle pri nizki ločljivosti (Ruzin, 1999).

2.2.1 Sonde

Sonda za hibridizacijo *in situ* je označen fragment DNA ali RNA (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). Sondo izberemo glede na vrsto nukleinske kisline, ki jo želimo zaznati in glede na pogoje poskusa. Mogoča je uporaba različnih sond, z različnimi prednostmi in slabostmi. Tipi sond so tako dvoverižna DNA, enoverižna DNA, enoverižna komplementarna RNA in umetni oligonukleotidi. Kot sonde se lahko uporabi tudi začetne oligonukleotide za PCR.

2.2.1.1 DNA sonde

Glavna prednost dvoverižne DNA je lahka izgradnja, saj je ni potrebno subklonirati in nanjo lahko pripnemo različne označevalce. Sonde imajo visoko specifičnost in občutljivost, ki jo lahko še povečamo z navzkrižno hibridizacijo začetne hibridizirane verige s komplementarno označeno verigo. Glavna slabost je, da sta obe verigi prisotni v raztopini sonde in jo je potrebno pred hibridizacijo denaturirati. Poleg tega obe verigi sonde tekmujeta za vezavo s tarčno DNA in s komplementarno verigo sonde, kar zmanjša občutljivost. Uporaba enoverižne DNA se izogne tem oviram, zahteva pa kompleksna subkloniranja za pripravo sonde (Montgomery, 2002).

2.2.1.2 RNA sonde

V rastlinskih tkivih je pogosta težava močan signal ozadja, zato se pogosteje uporablja RNA sonde (Ruzin, 1999). Tudi za enoverižno komplementarno RNA veljajo prednosti enoverižne DNA. RNA-RNA hibridi so mnogo bolj stabilni kot DNA-RNA hibridi, ti pa bolj kot DNA-DNA hibridi. To omogoča strožje pogoje spiranja, kar izboljša signal v primerjavi s signalom ozadja. To razmerje izboljša tudi uporaba RNaz, ki uničijo nehibridizirano RNA. Slabost RNA sond je visoka stopnja nespecifičnih vezav na komponente tkiva, kar pa spet lahko vodi do močnejšega signala ozadja in slabše penetracije sonde v tkivo (Montgomery, 2002). Uporaba RNA sond zahteva tudi posebne postopke za odstranitev vsepovsod prisotnih RNaz (Ruzin, 1999).

2.2.1.3 Oligonukleotidne sonde

Za detekcijo mRNA se večinoma uporablajo RNA sonde, vendar so zelo nestabilne. Sintetični oligonukleotidi predstavljajo odlično alternativo (Borlido in sod., 2002).

Pred dvema desetletjema so opisali kemično sintezo oligonukleotidov z vezanimi funkcionalnimi skupinami (npr. primarni alifatski amini in sulfhidrilne skupine). Te lahko reagirajo s hapteni, fluorokromi in encimi in tako tvorijo stabilne označene sonde, ki jih lahko uporabimo v eksperimentih hibridizacije *in situ* (Roche Applied Science, 2002/2003). Prednosti oligonukleotidnih sond so, da za njihovo uporabo ni potrebnih posebnih znanj rekombinantne DNA tehnologije in molekulskih postopkov za njihovo pripravo, tako da je njihova sinteza lahko avtomatizirana. Molekule so stabilne, zaradi kratkosti sond je njihova penetracija v tkivo dobra, zaporedje nukleotidov je lahko zelo natančno in ker je sonda enoverižna, ni tekmovanja med sondami in ni potrebna denaturacija. Slabosti pa se nanašajo na omejene možnosti označevanja teh sond. Tudi hibridi so zaradi kratkega zaporedja manj stabilni. Poleg tega je potrebno natančno poznati tarčna zaporedja, da zanje lahko naredimo sonde (Montgomery, 2002). Označeni sintetični oligonukleotidi (14-30 bp dolgi) se pogosto uporablajo, ko morata biti koncentracija soli in temperatura prirejeni. Uporablja se jih tudi za »primer extension *in situ*« in »PCR *in situ*«, za detekcijo ponavljačih zaporedij (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.1.4 Začetni oligonukleotidi za PCR

Uporaba začetnih oligonukleotidov za PCR kot hibridizacijskih sond ima prednosti pred klasičnimi sondami *in situ*. Glavni prednosti poleg visoke specifičnosti so, da so začetni oligonukleotidi za PCR dostopni za večino znanih mikroorganizmov, in da se jih da na 3' koncu enostavno označiti (Webb et al., 1999).

2.2.2 Označevanje sond

Za hibridizacijo *in situ* je potrebno zaporedja označiti, da lahko kasneje zaznamo njihovo lokacijo. Obstajata dva tipa metod označevanja: neposredno in posredno (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.2.1 Neposredno označevanje

Pri neposrednih metodah je poročevalska molekula vezana neposredno na sondu, tako da lahko hibride med sondu in tarčnim zaporedjem opazujemo pod mikroskopom takoj po hibridizaciji. V tem primeru mora vez med sondu in poročevalsko molekuljo prestatи grobe pogoje hibridizacije in pohibridizacijskih spiranj. Še pomembnejše pa je, da poročevalska molekula ne ovira procesa hibridizacije. Tem kriterijem ustrezajo radioaktivno označevanje, označevanje RNA sond s fluorokromi in direktno označevanje nukleinskih kislin z encimi (Roche Applied Science, 2002/2003).

2.2.2.1.1 Radioaktivno označevanje

Na samem začetku, po letu 1960, ko so metodo hibridizacije *in situ* razvili, so za označevanje uporabljali radioaktivne atome (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). Prednosti radioaktivnega označevanja so, da se izotopi zlahkoto vrinejo v sonde z uporabo običajnih encimov za sintezo. Take sonde so bolj občutljive in omogočajo kvantitativno analizo (Montgomery, 2002). Slabosti so slabša prostorska ločljivost (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000), dolgi eksponicijski časi, manjša stabilnost, manjša varnost in težave z radioaktivnimi odpadki (Montgomery, 2002).

Uporaba sond označenih z neradioaktivnimi označevalci je odstranila večino glavnih ovir in odprla nove možnosti uporabe različnih označevalcev v enem poskusu (Roche Applied Science, 2002/2003).

2.2.2.1.2 Označevanje s fluorokromi

Fluorokromi so kemične spojine, ki po ekscitaciji s svetlobo določene valovne dolžine fluorescirajo z oddajanjem svetlobe daljših valovnih dolžin (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

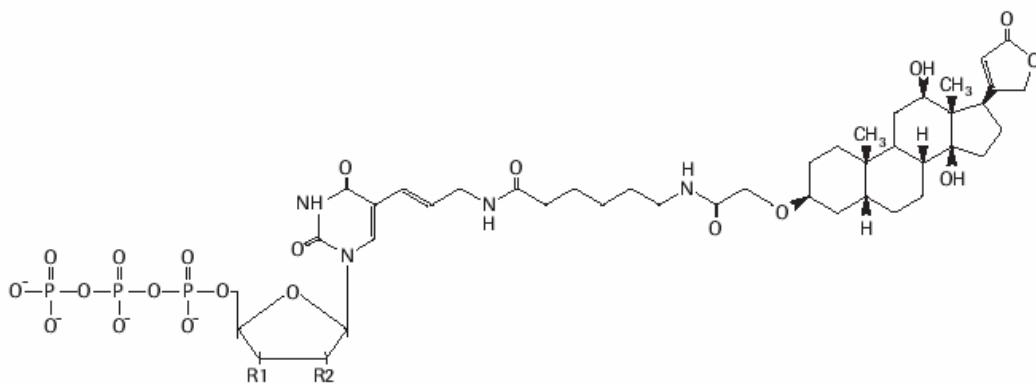
Ker je metoda neposredna, nadaljnji postopki za vizualizacijo niso potrebni in signal ozadja je šibek. Slabost te metode je, da je manj občutljiva kot posredne metode. Pogosteje se jo uporablja za DNA hibridizacijo *in situ*, saj so lokacije hibridizacijskih signalov prostorsko omejene, karakteristične in se jih lahko loči od signala ozadja (Roche Applied Science, 2002/2003). Slabost direktno označenih sond s fluorokromi je manjša občutljivost, prednost pa je, da lahko hkrati uporabljamo več različno označenih sond (Montgomery, 2002).

2.2.2.2 Posredno označevanje

Metoda z neposrednim označevanjem se lahko uporablja tudi kot del posrednih metod. Označene nukleotide lahko zaznamo s konjugiranimi protitelesi ali nekonjugiranimi, ki jih zaznamo s sekundarnimi označenimi protitelesi. S tem se občutljivost poveča (Roche Applied Science, 2002/2003). Tudi tu prisotnost označevalca ne sme vplivati na reakcijo hibridizacije in stabilnost hibrida, poročevalska molekula pa mora biti dostopna za protitelesa (Roche Applied Science, 2002/2003).

2.2.2.2.1 Označevanje z digoksigeninom

Prvi postopek za označevanje DNA z digoksigeninom (DIG) (Slika 1) je bil uporabljen leta 1987. Metoda temelji na steroidnem izolatu naprstca (*Digitalis purpurea* in *Digitalis lanata*). V času cvetenja so njegovi listi edini naravni vir digoksigenina. Protitelesa proti digoksigeninu se ne vežejo na noben drug biološki material. Digoksigenin je vezan na C-5 mesto uridinskega nukleotida z verigo osmih ogljikovih atomov. Nukleotidi se z določeno gostoto vgradijo v sondu s pomočjo DNA polimeraz, RNA polimeraz ali terminalne transferaze. Nukleinske kisline se lahko označi tudi kemično z DIG-NHS estrom, vendar je encimsko označevanje bolj pripravno in učinkovito (Roche Applied Science, 2002/2003).



Slika 1: Molekula digoksigenina (Roche Applied Science, 2002/2003, str. 12).

Hibridizirane sonde lahko z visoko afiniteto zaznamo s protitelesi proti digoksigeninu, ki so povezana z alkalno fosfatazo, peroksidazo, različnimi fluorokromi ali koloidnim zlatom. V uporabi pa so tudi nekonjugirana protitelesa in konjugirana sekundarna protitelesa. Občutljivost detekcije je odvisna od metode vizualizacije. Ob uporabi protiteles konjugiranih z alkalno fosfatazo je vizualizacija mogoča s kolorimetričnimi (NBT (4-nitroblue tetrazolijev klorid) in BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat)) ali fluorescentnimi (HNPP) substrati za alkalno fosfatazo. S to metodo lahko po prenosu po Southernu zaznamo 0,1 pg DNA (Roche Applied Science, 2002/2003).

2.2.2.2 Označevanje z biotinom

Sonde lahko označimo z biotinom, ki ga zaznamo z avidinom ali s protitelesi (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). Težavo predstavlja naravna prisotnost biotina v tkivih. Razvili so številne metode za blokiranje endogenega biotina, vendar niso vedno učinkovite, zato sta za označevanje bolj uporabna digoksigenin in fluorescein.

2.2.3 Izvedba hibridizacije *in situ*

Pri pripravi poskusa hibridizacije *in situ* je potrebno premisliti o fiksaciji tkiva in vklapljanju, rezanju na rezine, označevanju sonde, endogeni prisotnosti biotina in aktivnosti encimov ter o želeni občutljivosti (Borlido in sod., 2002).

2.2.3.1 Priprava raztopin in posode

V postopku hibridizacije *in situ* je potrebno preprečiti aktivnost RNaz in DNaz v vzorcih tkiva in raztopinah. RNA je zelo labilna molekula, ki se hitro razgradi, ko je izpostavljena, zato morajo biti vedno upoštevani previdnostni ukrepi za preprečevanje prisotnosti RNaz. Ti se izvajajo vse dokler RNA ni stabilizirana z vezavo sonde. Uporabljati je potrebno rokavice in sterilno posodo. Medtem, ko se DNaze med avtoklaviranjem razgradijo, RNaze preživijo, zato je potrebno vodo in vse raztopine obdelati z DEPC (dietil pirokarbonatom), ki inaktivira RNaze. Za premikanje objektnih stekelc se uporablja plastične pincete obdelane s 70% etanolom in sprane z DEPC vodo (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.3.2 Fiksacija tkiva

Da se morfologija biološkega materiala ohrani, ga je potrebno fiksirati, vendar je s kemičnega vidika nekaj omejitev (Roche Applied Science, 2002/2003). Pri izbiri metode fiksacije tkiva moramo uravnovesiti: 1. dostopnost tarčnega zaporedja za sondu; 2. ohranitev maksimalne količine tarčne DNA oz. RNA v tkivu; 3. ohranitev morfolologije tkiva (Tecott in sod., 1987 cit. po Montgomery, 2002; Hofler, 1990, cit. po Montgomery, 2002).

Uporaba precipitajočih fiksativov, kot so mešanice alkohola in ocetne kislina, omogoča dobro penetracijo sonde, vendar povzroča izgubo RNA iz tkiva (Montgomery 2002) in slabšo morfologijo preparata (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). Ocetna kislina je univerzalen fiksativ za razmaze. Uniči proteine, da postane kromosomska DNA dostopna in pomaga pri pritrdirtvji materiala na objektne stekelce (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). Glutaraldehid ohrani tako RNA v tkivu, kot tudi morfologijo tkiva, vendar zaradi

zamreženosti proteinov sonda težko penetrira v tkivo in so tako nukleinska zaporedja nedostopna (Montgomery, 2002). Najbolj uporaben fiksativ je tako 4% raztopina paraformaldehida, za katero je značilno ugodno razmerje med vsemi tremi zahtevami (Montgomery, 2002).

Tkivo pogosto tudi zamrznejo v tekočem dušiku, ga narežejo in fiksirajo v paraformaldehidu. Slabost je slabše ohranjena morfologija tkiva, vendar pa se tkivo lahko uporabi tako za hibridizacijo *in situ* kot tudi za izolacijo DNA in RNA (Montgomery, 2002).

Alternativo klasičnim fiksativom so Borlido in sod. (2002) uporabili Histochoice MB (Amresco), neškodljiv fiksativ, ki ne zamreži proteinov. Morfološka struktura se po fiksaciji s tem fiksativom dobro ohrani, ohranjensot nukleinskih kislin je dobra, ob tem pa je dobra tudi dostopnost za sondu.

2.2.3.3 Priprava tkivnih rezin

2.2.3.3.1 Vklapljanje vzorcev tkiva in rezanje rezin

Hibridizaciji *in situ*, ki omogoča analizo ekspresije genov in zaznava prisotnost bakterij ter virusov v okuženih tkivih, se običajno izvaja na rezinah pritrjenih na objektnih stekelcih.

Za vklapljanje in rezanje rezin se običajno uporablja parafin, saj se ga lahko nareže na do 2 µm tanke rezine, pri čemer se morfologija ohrani. Parafin je potrebno pred hibridizacijo temeljito odstraniti za boljšo dostopnost tarče (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Na serijskih parafinskih rezinah se lahko opazuje struktura, tridimenzionalna zgradba, mogoči pa so tudi vzporedni poskusi. Nekaterih tkiv se ne da vklopiti v parafin tako, da bi se morfologija zadovoljivo ohranila. V tem primeru se uporablja akrilne smole in polietilenglikol. Za boljšo ločljivost in opazovanje pod elektronskim mikroskopom se uporablja smole. Najboljša občutljivost je pri zamrznjenem materialu z minimalno kemično fiksacijo, vendar se morfologija slabše ohrani (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Glede na želeno debelino rezin je potrebna previdnost in natančnost pri rezanju. Rezine se nareže s pomočjo mikrotoma ali ultramikrotoma (pri tem se vklopljen ali zamrznjen material pomika ob statičnem rezilu), ali pa s pomočjo hitro vibrirajočega rezila (Vibratome) narežemo svež ali vklopljen material (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Za izboljšanje adhezije celic in rezin na objektna stekelca so lahko uporablja premaz s poli-L-lizinom ali pa silanom (3-aminopropiltrioksi-silan). Ti reagenti prevlečejo stekelca z

nabitimi skupinami, ki izboljšajo vezavo rezin na objektnik, da se obdržijo na njem med dolgotrajnim postopkom hibridizacije (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.3.3.2 Permeabilizacija s proteazami

Proteolitična razgradnja preparatov s proteazami, proteinazo K ali pronazo E, se uporablja za delno odstranitev proteinov, ki povečajo signal ozadja in ovirajo dostop sond do tarče, v manjši meri pa tudi razgrajujejo nukleaze. Proteolitična razgradnja je potrebna po fiksaciji s paraformaldehidom in glutaraldehidom, ki zamrežita proteine. Izboljša signal sond daljših od 100 bp, ni pa potrebna pri oligonukleotidnih sondah. Koncentracija in čas delovanja morata biti natančno prilagojena glede na material. Pronaza E je primernejša za nekatera tkiva, saj je širše specifična in je primernejša za rastlinski material. Optimalna koncentracija proteinaze in dolžina obdelave sta odvisni od tkiva in ju je potrebno empirično določiti. Obdelava s kislinami, detergenti in pepsinom so nežnejša in manj učinkovita za tkiva fiksirana s fiksativi, ki zamrežijo proteine. Po obdelavi s proteinazami je preparate potrebno ponovno fiksirati v paraformaldehidu, da se tkivo stabilizira in ohrani nukleinske kisline (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.3.3.3 Alternativna fiksacija in rezanje svežih rezin

Po metodi, ki so jo opisali Borlido in sod. (2002), se je mogoče izogniti grobim postopkom, ki poslabšajo morfološko zgradbo. Tkiva se ne dehidrira, ne vklaplja v smolo ali parafin, pri čemer se izogne uničenju tkiva in omogočena je boljša penetracija sonde. Uporaba proteinaze K in drugih proteaz, ki uničuje s fiksativi povezane proteine in poveča dostopnost tarče, uničuje tudi morfologijo celic (Pringle, 1995, cit. po Borlido in sod., 2002). Ob uporabi fiksativa Histochoice MB (Amresco), ki ne zamreži proteinov, razgradnja s proteazami ni potrebna. Tkivo, fiksirano v Histochoice, se lahko nareže z vibratomom. Morfološka zgradba se pri tem dobro ohrani, ločljivost pa je dobra, kljub temu da so rezine debele. Vibratomske rezine predstavljajo prednost pred kriorezinami zamrznjenega materiala in rezinami tkiva vklopljenega v parafin. Pri zamrznjenih rezinah se slabo ohrani struktura, pri v parafin vklopljenih rezinah pa je potrebno odstraniti vosek, rehidrirati v seriji grobih in dolgotrajnih korakov, zamrežene proteine pa delno razgraditi s proteinazami. Tkivo, vklopljeno v epoksi ali hidrofilne smole, je slabo permeabilno za sonde (Bendayan in sod., 1984, cit. po Borlido in sod., 2002). Na vibratomu se rezine hitro nareže in, čeprav so debelejše (povprečno 50 µm) kot parafinske rezine, je občutljivost boljša, saj je več tarčnih molekul dostopnih za sondu. Tehnika je uporabna tudi zaradi dostopnosti konfokalnega mikroskopa (Borlido in sod., 2002). Z uporabo mikrotiterskih plošč za inkubacijo in menjavo raztopin v luknjicah se izognemo uporabi poli-L-lizina ali silana, ki sta potrebna za adhezijo rezin na objektna stekelca. Adhezivi lahko v postopku hibridizacije vežejo še druge snovi, kar prispeva k višjemu signalu ozadja.

2.2.3.4 Hibridizacija *in situ*

2.2.3.4.1 Acetilacija

Obdelava rezin z anhidridom ocetne kisline zmanjša možnost elektrostatične vezave sonde na rezine z acetilacijo pozitivno nabitih amino skupin, kot jih imajo npr. bazični proteini. Acetilacija prepreči tudi nespecifično vezavo sonde na s poli-L-lizinom prevlečena objektna stekelca in odstrani endogeni biotin ter s tem nespecifični signal ozadja. Prav tako tudi inaktivira proteaze (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.3.4.2 Predhibridizacija

Pred samo hibridizacijo *in situ* 1-2 uri material predhibridiziramo v hibridizacijskem pufru brez sonde na temperaturi hibridizacije. To zagotovi dobro penetracijo sonde v tkivo in blokiranje nespecifičnih vezavnih mest (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). S postopkom predhibridizacije zmanjšano signal ozadja (Roche Applied Science, 2002/2003). Za rezine ta postopek ni nujen in včasih vodi celo v zmanjšanje signala, saj se sonda še bolj razredči. Rezine lahko pred dodatkom hibridizacijske mešanice dehidriramo, da zagotovimo točne koncentracije reagentov in sonde (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.3.4.3 Hibridizacija

Dvoveržna tarčna zaporedja je potrebno pred hibridizacijo denaturirati na 85 do 95°C, medtem ko RNA tarč ni potrebno denaturirati (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Hibridizacija poteka tako, da majhno količino raztopine sonde nanesemo na objektno stekelce z rezinami tkiva, pokrijemo s krovnim stekelcem in inkubiramo na določeni temperaturi. Pod krovnim stekelcem moramo odstraniti vse mehurčke, saj v nasprotnem primeru na mestu mehurčka ne bo obarvanja (Montgomery, 2002). V večini protokolov hibridizacija poteka čez noč. V tem času sonde najdejo svoja komplementarna zaporedja. Nekaj-urne hibridizacije so primerne za ponavljajoča zaporedja (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

V hibridizacijski mešanici je poleg sonde še inertna DNA, izolirana iz lososove ali slanikove sperme ali iz *E. coli*, ki tekmuje s sondom pri nespecifični vezavi na proteine in druga vezavna mesta. V hibridizacijski mešanici je običajno hidratirana komponenta, ki veže prosto vodo in s tem poveča efektivno koncentracijo sonde. V ta namen uporabljajo dekstran sulfat, polivinilpirolidon in Ficoll (Roche Applied Science, 2002/2003). SDS (natrijev dodecilsulfat) omogoča boljšo penetracijo sonde. EDTA (etilendiamin tetraacetat) veže Mg²⁺ ione, ki aktivirajo nukleaze (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Specifičnost vezave sonde na tarčno zaporedje je odvisna od: dolžine in zgradbe sonde, temperature, pH, koncentracije formamida in monovalentnih kationov v hibridizacijskem

pufru. S spremenjanjem teh parametrov je mogoče spremeniti afiniteto sonde do tarčnega zaporedja. Za hibridizacijo so pogoji nastavljeni tako, da omogočajo vezavo sonde na tarčno zaporedje, ne pa na nespecifična zaporedja (Montgomery, 2002).

Zaradi penetracije sonde v zamreženo tkivo, je dolžina sonde kritična. Optimalna dolžina sonde je odvisna od tkiva in njegove priprave. Priporočljive so dolžine med 50 in 200 bp. Krajše sonde oblikujejo manj stabilne hibride, vendar pa je krajši fragment s 100% homologijo bolj stabilen kot daljši z manjšo homologijo. Stabilnost je odvisna tudi od položaja nepravilnih parjenj (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Tudi vsebnost nukleinskih kislin vpliva na vezavo sonde. V baznem paru G-C nastanejo 3 vodikove vezi, medtem ko v paru A-T le dve. Tako višja vsebnost baznih parov G-C poveča temperaturo taljenja hibridov in s tem zmanjša strogost (specifičnost) vezave (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Med hibridizacijo in spiranji mora biti temperatura natančno nadzirana. Spremembra za 1°C spremeni strogost za 1%. Običajno hibridizacija poteka med 25 in 65°C, vendar je potrebno pri tem upoštevati druge dejavnike, kot so poškodbe morfologije in odlepljanje rezin pri višjih temperaturah (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Tako pod alkalnimi kot tudi pod kislimi pogoji DNA denaturira. Za kontrolo strogosti vezave se spremenjanje pH običajno ne uporablja in ima med 5 in 9 le manjši učinek (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Pri nižjih koncentracijah monovalentnih kationov so hibridi manj stabilni. Koncentracijo monovalentnih kationov (predvsem natrija) kontroliramo z dodatkom šibkega pufera SSC (pufer z natrijevim kloridom in natrijevim citratom) ali natrijevim fosfatnim pufrom med 1 M in 20 mM (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Formamid destabilizira dvojno vijačnico, kar omogoča nižje temperature hibridizacije in višje koncentracije soli pri enaki strogosti vezave. Zaradi toksičnosti te organske tekočine (CH_3NO) se zmanjšuje njena uporaba (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.3.4.4 Posthibridizacijska spiranja

Po hibridizaciji sledi serija spiranj. Spiranje odstrani nevezane ali slabše vezane sonde in hibridizacijsko mešanico. Pogoje je potrebno prilagoditi glede na temperaturo taljenja hibridov, pa tudi glede na dolžino sonde in metodo označevanja. Nižja kot je koncentracija soli in višja kot je temperatura, bolj so zaostreni pogoji spiranja (Roche Applied Science, 2002/2003). Če so pogoji spiranja preveč zaostreni, lahko izgubimo občutljivost, v nasprotnem primeru pa se poveča signal ozadja (Montgomery, 2002). Oligonukleotidi zahtevajo nežnejša spiranja. Temperaturo med spiranji je potrebno nadzorovati. Če se

temperatura dvigne le za nekaj stopinj, lahko odstrani večino vezane sonde (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Različni protokoli predvidevajo različno strogost spiranj. Ponekod priporočajo bolj stroge pogoje spiranja, kot za hibridizacijo (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000), drugod pa strožjo hibridizacijo in manj stroga spiranja (Roche Applied Science, 2002/2003)

2.2.3.5 Detekcija hibridiziranih mest

Detekcija hibridiziranih mest je pomemben del hibridizacije, saj omogoča lokalizacijo hibridov med sondom in tarčo. Detekcijski koraki so odvisni od označevalca vezanega na sondu (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Pri uporabi s fluorokromi označenih nukleotidov lahko signal zaznamo že neposredno s fluorescenčno mikroskopijo. Pogosto se uporablja tudi protitelesa za fluorokrome, še posebej za fluorescein. Pri tem se signal ojača. Fluorokromi se uporabljajo za detekcijo DNA v kromosomih, saj omogočajo natančno lokalizacijo signala in lokalizacijo več tarč z različnimi fluorokromi (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

S posrednimi metodami reporterske molekule zaznamo s protitelesi. Digoksigenin zaznavamo s protitelesi proti digoksigeninu, sonde označene z biotinom pa z avidinom ali protitelesi proti biotinu (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). Protiteesa in avidini so konjugirani s fluorokromi, encimi ali kovinami in tako omogočajo različne načine detekcije, odvisno od želene občutljivosti in ločljivosti (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

2.2.3.5.1 Detekcija protiteles konjugiranih z encimi

Kolorimetrična detekcija s protitelesi konjugiranimi z encimi, ki katalizirajo precipitacijo obarvanih pigmentov iz substratov, je zelo občutljiva, vendar težavnejša, manj prostorsko definirana in lahko jo omejuje nespecifičen signal ozadja (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). Prednost je tudi stabilnost precipitatov. Glede na pogostost tarče reakcija lahko poteka nekaj minut, ur ali dni (Roche Applied Science, 2002/2003). Analizira se jo lahko s presevno svetlobno mikroskopijo. Pogosteje se jo uporablja za detekcijo RNA (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Najpogosteje se uporablja alkalna fosfataza konjugirana s protitelesi ali avidinom. Pogosto se uporablja tudi hrenova peroksidaza, β -galaktozidaza in glukozna oksidaza (Roche Applied Science, 2002/2003).

2.2.3.5.1.1 Alkalna fosfataza

Kot substrat za alkalno fosfatazo (AP) se uporablja BCIP/NBT (5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat/nitroblue tetrazolium) (Roche Applied Science, 2002/2003). Alkalna fosfataza odcepi fosfatno skupino z BCIP in reducira NBT, nastane v vodi netopen vijolično obarvan precipitat (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). Aktivnost alkalne fosfataze se lahko zazna tudi z nekaterimi drugimi barvili, npr. s Fast Red (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000). BCIP/NBT je eden najbolj občutljivih encimskih substratov, vendar se v rastlinskem tkivu barvilo NBT veže na ksilemske sekundarne stene. Uporaba polivinilnih alkoholov v barvnih raztopinah (De Block in Debrouwer, 1996, cit. po Borlido in sod., 2002) prepreči difuzijo reakcijskih intermediatov.

Ker je v nekaterih tkivih prisotna endogena encimska aktivnost, ki lahko povzroči močan nespecifični signal, se za utišanje endogene aktivnosti fosfataz uporablja levamisol, vendar ta obdelava ni vedno potrebna, saj se aktivnost endogenih fosfataz izgubi med hibridizacijo (Roche Applied Science, 2002/2003).

2.2.3.5.1.2 Hrenova peroksidaza

Kot substrat za hrenovo peroksidazo se najpogosteje uporablja DAB (diaminobenzidin) (Roche Applied Science, 2002/2003). Hrenova peroksidaza razcepi DAB v rjav precipitat, ki je netopen v alkoholu, ksilenu in vodi (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Endogeno encimsko aktivnost peroksidaz lahko utišamo z 1% H_2O_2 v metanolu za 30 minut (Roche Applied Science, 2002/2003), lahko pa tudi s peridatom, borohidridom, natrijevim nitrofericianidom ali pa fenil hidrazinom (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Ker sta produkta delovanja hrenove peroksidaze in alkalne fosfataze različnih barv, se ju lahko uporablja za dvojno hibridizacijo. Signal obeh metod se lahko ojača z zlatom in srebrom, barvo se lahko spremeni tudi s težkimi kovinami (Roche Applied Science, 2002/2003).

2.2.3.5.2 **Pomnožitev signala s tiramidnim sistemom**

Pomnožitev signala s tiramidnim sistemom je encimska detekcijska metoda, ki izkorišča katalitično aktivnost hrenove peroksidaze za tvorbo gosto označenega tarčnega proteina ali nukleinskega zaporedja. Je kombinacija treh procesov:

1. vezava sonde na tarčo, čemur sledi detekcija sonde z protitelesi ali streptavidinom označenimi s hrenovo peroksidazo
2. hrenova peroksidaza aktivira večje število molekul tiramidnega derivata označenega, s haptenom

3. kovalentno spajanje visoko reaktivnih in kratkoživečih tiramidnih radikalov z nukleofilnimi ostanki v bližini hrenove peroksidaze na tarči, kar močno ojača signal, vendar ga tudi prostorsko omeji zaradi kratkega časa difuzije tiramidnih radikalov (Tyramide Signal Amplification Kits, Molecular Probes, 2005).

Tiramidne radikale lahko zaznavamo z direktnimi fluorescentnimi metodami ali indirektno s kromogenimi metodami. S tiramidnim sistemom lahko signal hibridizacije *in situ* pomnožimo do 1000-krat (Ruzin, 1999). Prednosti te metode so zelo občutljiva detekcija tarč nizke gostote in uporaba nižje koncentracije protiteles in sond. Optimalna koncentracija sonde je 2-10 krat manjša kot pri konvencionalnih imunocitokemičnih detekcijskih postopkih. To je pomembno pri detekciji kratkih oligonukeotidnih sond in redkih mRNA s hibridizacijo *in situ* (Tyramide Signal Amplification Kits, Molecular Probes, 2005).

2.2.3.6 Kontrole

Da lahko ocenimo signal hibridizacije in ga lahko ločimo od signala ozadja, je vedno potrebno uporabiti kontrolne postopke. DNA:DNA hibridizacija običajno ne zahteva kontrol, saj so tarče dobro definirane in so enake v vsaki celici. Pri mRNA, virusih in bakterijah ni specifične distribucije, da bi lahko uporabili za kontrole notranje standarde. Poleg tega je v tkivih endogeno prisotnih veliko encimov, ki lahko zasenčijo pozitivni signal. Zaporedne rezine istega tkiva so primerne za primerjavo kontrolnega in hibridiziranega tkiva (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000).

Kontrole lahko razdelimo na pozitivne in negativne. S pozitivnimi kontrolami preverimo delovanje postopka hibridizacije in detekcije:

- tkivo, ki zagotovo vsebuje tarčno nukleotidno zaporedje,
- označena sonda komplementarna pogosti tarči v celicah, kot je npr. mRNA za α -tubulin (vzdrževalni/hišni geni).

Z negativnimi kontrolami preverimo obseg in razporeditev nespecifične hibridizacije in signala ozadja, ki je posledica nespecifične vezave sonde ali pa endogene encimske aktivnosti (Schwarzacher in Heslop-Harrison, 2000):

- uporaba smiselnih sond, ki imajo enako zaporedje kot tarča, in se zato ne vežejo na tarčo (protismiselne sonde imajo komplementarno zaporedje in se vežejo na tarčo)
- tkivo, ki ne vsebuje tarčnega zaporedja komplementarnega protismislne sonde,
- hibridizacija s sondom, ki zagotovo ni zastopana v tkivu (nesmiselna sonda),
- razgradnja RNA z RNazami pred hibridizacijo, da zagotovo ni tarče v preparatu,
- hibridizacija brez sonde, da preverimo specifičnost detekcije,
- hibridizacija brez ali z sondom v kombinaciji z detekcijskimi koraki brez protiteles, da pokažemo, da encim konjugiran s protitelesi ni prisoten endogeno

Za določeno zaporedje lahko uporabimo tudi več sond, ki se med seboj le malo razlikujejo. S tem lahko ugotovimo, če zaznavamo podobna zaporedja ali točno določeno. Rezine lahko najprej hibridiziramo z neoznačenimi sondami in nato še z označenimi. S tem preprečimo označitev tarčnih zaporedij, vidimo pa le ozadje. Pri detekciji mRNA se lahko ozadja znebimo z uporabo RNaz po hibridizaciji. S hibridizacijo prenosa northern lahko dokažemo, da se označena sonda veže na tarčno zaporedje prave molekulske velikosti. Z imunohistokemijo lahko dokažemo proteinski produkt tarčnega gena. Negativni rezultat tega poskusa pa ni nujno neuspešna hibridizacija *in situ*, pač pa tudi neprevedena mRNA ali pa se nastali protein hitro transportira drugam (Montgomery, 2002).

2.2.3.7 Mikroskopija

2.2.3.7.1 Svetlobna presevna mikroskopija

Pri svetlobni mikroskopiji slika nastane pri prehodu svetlobe skozi preparat. Vrednotenje rezultatov hibridizacije *in situ* je pri svetlobni mikroskopiji lahko najbolj rutinsko z uporabo encimskih označevalcev, saj so preparati obstojni (Roche Applied Science, 2002/2003).

2.2.3.7.2 Fluorescenčna mikroskopija

Fluorescenčni mikroskop vsebuje izvor svetlobe za ekscitacijo fluorokromov in filtre, ki prepuščajo svetlobo, ki jo fluorokromi nato emitirajo. Metoda je lahko visoko občutljiva. Uporablja se lahko za ekscitacijo več različnih fluorokromov z različnimi spektri izsevanje svetlobe, kar omogoča zaznavanje več različnih tarč (Roche Applied Science, 2002/2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Priprava raztopin

DEPC voda (1 l):

- 1 l dH₂O (destilirana voda)
- 1 ml DEPC (Sigma)
- čez noč mešanje v digestoriju na magnetnem mešalu
- 2 x avtoklaviramo 15 min na 120°C

Za pripravo nadaljnih raztopin lahko uporabimo DEPC vodo, ali pa jih pripravimo z destilirano vodo in nato dodamo DEPC do 0,1% (v/v), mešamo čez noč in avtoklaviramo.

3.1.1 Priprava raztopin za sterilizacijo posode:

3% H₂O₂ (2 l):

- 200 ml 30% H₂O₂ (Belinka)
- 1800 ml d H₂O

3.1.2 Priprava raztopin za hibridizacijo:

5 M NaCl (100 ml):

- 29,22 g NaCl (Merck)
- do 100 ml DEPC vode
- avtoklaviramo

145 mM NaCl (200 ml):

- 6 ml 5 M NaCl
- do 200 ml DEPC vode

10x PBS (fosfatni pufer s soljo) (100 ml):

- 7,60 g NaCl (Sigma)
- 0,99 g Na₂HPO₄ (Sigma)
- 0,43 g NaH₂PO₄·2H₂O (Merck)
- 90 ml DEPC vode, raztopimo soli
- pH uravnamo na 7,4 z 1 M NaOH ali 1 M HCl
- do 100 ml DEPC vode
- avtoklaviramo

1x PBS (200 ml):

- 20 ml 10x PBS
- do 200 ml DEPC vode

20x SSC (20 ml):

- 3,5 g NaCl
- 1,76 g Na-citrat dihidrat (Kemika)
- 18 ml DEPC vode
- uravnamo pH na 7 z 1 M NaOH
- do 20 ml DEPC vode
- avtoklaviramo

10x SSC (40 ml):

- 20 ml 20x SSC
- 20 ml DEPC vode

2x SSC (110 ml):

- 11 ml 20x SSC
- do 110 ml DEPC vode

10% SDS (100 ml):

- 90 ml DEPC vode
- segrevamo na 68 °C in mešamo na mešalniku
- postopoma dodajamo 10 g SDS
- do 100 ml DEPC vode
- ne avtoklaviramo

0,5 M EDTA (10 ml):

- 1,46 g EDTA (Sigma)
- 8 ml DEPC vode
- mešamo na mešalniku in sproti dodajamo zrna NaOH (Scharlau), dokler se tekočina ne zbistri
- pH uravnamo na 8 z 1 M NaOH ali 1 M HCl
- do 10 ml DEPC vode
- avtoklaviramo

1 M Tris BASE (100 ml):

- 15,76 g Tris BASE (Sigma)
- do 100 ml DEPC vode (DEPC ne smemo dodati naknadno, ker uniči Tris)

1 M Tris HCl (100 ml):

- 12,11 g Tris HCl (Sigma)
- do 100 ml DEPC vode (DEPC ne smemo dodati naknadno, ker uniči Tris)

100 mM Tris-HCl pH 7,6 (40 ml):

- 3,2 ml 1M Tris HCl
- 0,8 ml 1M Tris BASE
- do 40 ml DEPC vode

Preglednica 1: pH vrednosti raztopin Tris-HCl.

pH	% 1M Tris-HCl
6,8	96
7,5	84
7,6	81
9,5	8

Etanolna (EtOH) vrsta (40 ml):

Preglednica 2: Priprava etanolne vrste (40 ml).

% EtOH	96%EtOH [ml]	145 mM NaCl [ml]
90	38	2
85	35	5
70	29	11
50	21	19
30	12,5	27,5

TE (50 mM TrisHCl, 5 mM EDTA) (1 ml):

- 50 µl 1 M TrisHCl pH 7,6 (40,5 µl 1 M TrisHCl in 9,5 µl 1 M Tris BASE)
- 10 µl 0,5 M EDTA
- 940 µl DEPC vode

oz.

- 500 µl 100 mM TrisHCl pH 7,6
- 10 µl 0,5 M EDTA
- 490 µl DEPC vode

3.1.3 Priprava raztopin potrebnih za okuževanje rastlin:

raztopina A (0,2 M) (1000 ml):

- 31,2 g NaH₂PO₄·2H₂O (Mw= 156,1) (Merck)
- 1000 ml dH₂O
- hranimo na -20°C

raztopina B (0,2 M) (1000 ml):

- 28,39 g Na₂HPO₄ (Mw= 141,96) (Merck)
- 1000 ml dH₂O
- hranimo na -20°C

0,02 M fosfatni pufer za mehansko inokulacijo (100 ml):

- 1,3 ml raztopine A (0,2 M):
- 8,7 ml raztopine B (0,2 M):
- 0,225 g DIECA (dietil ditiokarbonat, shranjen na 4°C) (Merck)
- do 100 ml dH₂O
- umerimo pH na 7,6
- hranimo na 4°C

3.1.4 Priprava fiksativov:

4% PF (paraformaldehid) (100 ml):

- 4,0 g paraformaldehyda (Acros Organics)
- 80 ml dH₂O
- 10 min segrevamo na 60°C, mešamo na magnetnem mešalu
- dodamo zrnca NaOH (Merck), da se tekočina zbistri
- ohladimo
- 10 ml 10x PBS
- umerimo pH na 7,4 s H₂SO₄ (Scharlau)
- do 100 ml dH₂O

4% PF z 0,1% TritonomX-100 (100 ml):

- 100 ml 4% PF dodamo 100 µl TritonX-100 (Sigma)

FAA (formalin-etanol-ocetna kislina) (80 ml):

- 40 ml 96% EtOH (Kefo)
- 8 ml 37% formalina (vodna raztopina formaldehyda) (J.T.Baker)
- 4 ml koncentrirane (led) ocetne kisline (Scharlau)
- 28 ml dH₂O

3.1.5 Lovljenje virusnih delcev na protitelesa

10x PBS II (1000 ml):

- 80 g NaCl (Merck)
- 2 g KH₂PO₄ (Merck)
- 11,4 g Na₂HPO₄ (Merck)
- 2 g KCl (Kemična tovarna Podnart)

- do 1000 ml dH₂O

Pufer za spiranje (PBS-Tween) (1000 ml):

- 100 ml 10x PBS II
- 0,5 ml Tween 20 (Bio-Rad)
- 800 ml dH₂O
- umerimo pH na 7,4
- do 1000 ml dH₂O

Ekstrakcijski pufer (1000 ml):

- 1000 ml PBS-Tween
- 20 g PVP (polivinil pirolidon) (40)
- 2 g BSA (goveji serumski albumin) (British BioCell International)
- umerimo pH na 7,4

Karbonatni pufer (1000 ml):

- 1,59 g Na₂CO₃ (Merck)
- 2,93 g NaHCO₃ (Kemika)
- 900 ml destilirane H₂O
- umerimo pH na 9,6
- do 1000 ml dH₂O

Pronaza E, 125 µg/ml (proteaza iz *Streptomyces griseus*, tip XIV (brez DNaz in RNaz); Sigma):

- 3 µl pronaze E, 40 mg/ml
- 957 µl TE

Proteinaza K:

- 11 µl proteinaze K (Roche), 18 mg/ml
- 979 µl TE
- za SDS+ dodamo 8 µl 10% SDS v 400 µl raztopine proteinaze K

3M Na acetat (10 ml):

- 2,46 g CH₃COONa (Sigma)
- do 10 ml dH₂O

1x TAE (tris acetatni pufer) (5 l):

- 100 ml 50x TAE (Fermentas)
- do 5 l dH₂O

3.1.6 Hibridizacija točkovnega odtisa

3.1.6.1 Hibridizacija točkovnega odtisa I, II, III

100x Denhardtova raztopina (25 ml):

- 0,5 g PVP (Sigma)
- 0,5 g Ficoll (Sigma)
- 0,5 g BSA (British BioCell International)
- do 25 ml DEPC vode
- steriliziramo z 0,2 µm filtrom
- alikvotiramo po 1 ml
- shranimo pri -20 °C

Predhibridizacijska mešanica I (110 ml):

- 22 ml 20x SSC (končna konc. 4x SSC)
- 1 ml 100x Denhardt-ove raztopine
- 1,1 ml 10% SDS
- 0,11 ml salmon sperm DNA (9,5 mg/ml) - pred uporabo denaturiramo na 99 °C (termo blok) 10 min
- 86 ml DEPC vode

1x SSC + 0,1% SDS (330 ml):

- 16,5 ml 20x SSC
- 3,3 ml 10% SDS
- do 330 ml DEPC vode

2x SSC (110 ml):

- 11 ml 20x SSC
- do 110 ml DEPC vode

Detekcijski pufer I (500 ml):

- 4,75 ml 1 M Tris BASE
- 20,25 ml 1 M Tris HCl
- 15 ml 5 M NaCl
- do 500 ml DEPC vode
- avtoklaviramo
- 500 µl Triton X-100

Raztopina za blokiranje I (220 ml):

- 1,1 g BSA
- 220 ml detekcijskega pufra I

Detekcijska raztopina I (40 ml):

- 8 µl Anti-Digoxigenin-AP; Fab fragmenti (Roche) (založna raztopina: 750 U/ml;
pred uporabo centrifugiramo 5 min na 14000 obr/min)
- 40 ml raztopine za blokiranje I

AP-substratni pufer I (50 ml):

- 1 ml 5 M NaCl
- 4,6 ml 1 M Tris BASE
- 0,4 ml 1 M Tris HCl
- do 50 ml DEPC vode
- avtoklaviramo

Substratna raztopina I (40 ml):

- 800 µl NBT/BCIP
- do 40 ml AP (alkalna fosfataza)-substratnega pufra I

2x SSC + 0,1% SDS (30 ml):

- 3 ml 20x SSC
- 0,3 ml 10% SDS
- do 30 ml DEPC vode

0,2x SSC + 0,1% SDS (30 ml):

- 0,3 ml 20x SSC
- 0,3 ml 10% SDS
- do 30 ml DEPC vode

3.1.6.2 Hibridizacija točkovnega odtisa IV, V, VI, VII

Pufer maleinske kisline (»maleic acid buffer«) (200 ml):

- 2,32 g maleinske kisline (končna koncentracija 0,1 M) (Sigma)
- 1,753 g NaCl (končna koncentracija 0,15 M) (Merck)
- pH 7,5 uravnamo z zrnici NaOH (Merck)
- avtoklaviramo

Pufer maleinske kisline + 0,3% Tween 20 (45 ml):

- 45 ml pufra maleinske kisline
- 135 µl Tween 20

10% reagent za blokiranje (100 ml):

- 10 g Blocking reagent (Roche)
- do 100 ml pufra maleinske kisline

- segrevamo in mešamo, da se stopi
- avtoklaviramo

1% reagent za blokiranje (15 ml):

- 1,5 ml 10% reagent za blokiranje
- do 15 ml pufra maleinske kisline

1 M fosfatni pufer (30 ml):

- 1,159 g NaH₂PO₄·H₂O (Merck)
- 3,067 g Na₂HPO₄ (Merck)
- do 30 ml DEPC vode
- avtoklaviramo

Predhibridizacijska mešanica II (»High SDS«) (15 ml):

- 3,75 ml 20x SSC (končna koncentracija 5 x SSC)
- 8 ml 10% SDS
- 3 ml 10% reagenta za blokiranje (končna koncentracija 2%)
- 0,75 ml 1M fosfatnega pufra (končna koncentracija 50 mM pH 7,2)
- 0,015 g N-laurilsarkozina (končna koncentracija 0,1%) (Sigma)

2x SSC + 0,1% SDS (30 ml):

- 3 ml 20x SSC
- 0,3 ml 10% SDS
- do 30 ml DEPC vode

0,5x SSC + 0,1% SDS (30 ml):

- 0,75 ml 20x SSC
- 0,3 ml 10% SDS
- do 30 ml DEPC vode

AP-substratni pufer II (30 ml)

- 1,6 ml 1 M TrisHCl
- 18,4 ml 1 M TrisBASE
- 0,6 ml 5M NaCl
- do 30 ml DEPC vode

Substratna raztopina II (15 ml):

- 300 µl NBT/BCIP
- do 15 ml AP-substratnega pufra II

Priprava pronaze E:

- pripravimo TE brez vode:
 - 40,5 µl 1 M TrisHCl
 - 9,5 µl 1 M TrisBASE
 - 10 µl 0,5 M EDTA
- zalogo pronaze E redčimo:
 - 3 µl 40 mg/ml pronaze E
 - 27 µl TE brez vode
- končna delovna raztopina: v 20 µl homogenata damo 0,62 µl redčene pronaze (32 x redčeno)

3.1.7 Hibridizacija *in situ*

Etanolna vrsta za rehidracijo parafinskih rezin (40 ml, v Coplinovih posodah):

- ksilen 10 min
- ksilen 10 min
- 100% EtOH 3 min
- 90% EtOH 3 min
- 85% EtOH 3 min
- 70% EtOH 3min
- 50% EtOH 3 min
- 30% EtOH 3 min
- 1x PBS 5 min

Med vsako prestavitvijo preparate odcedimo na papirnati brisači.

Pronaza E (založna koncentracija 40 mg/ml):

- 125 µg/ml -> 320x redčeno (3 µl pronaze E, 957 µl TE)
- 500 µg/ml -> 80x redčeno (11 µl pronaze E, 869 µl TE)
- 1000 µg/ml -> 40x redčeno (22 µl pronaze E, 858 µl TE)

10% glicin v vodi (založna raztopina):

- 1 g glicina (Sigma)
- do 10 ml DEPC vode
- filtracija skozi 0,2 µm filter
- shranimo na 4 °C

Pred uporabo razredčimo do 0,2% (40 ml):

- 800 µl 10% glicina
- d0 40 ml 1x PBS

2 M trietanolamin HCl:

- 5,97 g tekočega trietanolamina (Acros Organics)
- do 15 ml DEPC vode
- pH uravnamo na 8,0 z 20% HCl
- do 20 ml DEPC vode
- filtracija skozi 0,2 µm filter
- shranimo na 4 °C

0,1 M trietanolamin HCl:

- 1,5 ml 2 M trietanolamin-HCl
- 28,5 ml DEPC vode

50% dekstran sulfat (10 ml):

- 5 g dekstransulfata (Roth)
- 8 ml DEPC vode
- segrevamo na 65 °C, dokler se ne raztopi (nekaj ur)
- do 10 ml DEPC vode
- raztopino segrevamo v vodni kopeli na 50 °C za lažje pipetiranje in filtriranje
- filtracija skozi 0,2 µm filter
- alikvote po 50 µl, 100 µl in 200 µl shranimo na -20°C

Predhibridizacijska mešanica III:

- 200 µl 50% dekstransulfata
- 250 µl 20x SSC
- 550 µl DEPC vode

Predhibridizacijska mešanica IV:

- 130 µl 20x SSC (končna koncentracija 2x SSC)
- 260 µl 50% dekstran sulfata (končna koncentracija 10%)
- 910 µl DEPC vode

Hibridizacijska mešanica I:

- 8 µl 1,25 pmol/ µl sonde (končna koncentracija 0,05 pmol/ µl)
- 200 µl predhibridizacijske mešanice III

Hibridizacijska mešanica II:

- 52 µl sonde »O probe« (50 ng/µl) (končna koncentracija 2 ng/µl)
- 1248 µl predhibridizacijske mešanice IV

Detekcijski pufer II (500 ml):

- 4,75 ml 1 M Tris BASE

- 20,25 ml 1 M Tris HCl
- 15 ml 5 M NaCl
- do 500 ml DEPC vode
- avtoklaviramo
- 500 µl Triton X-100

Raztopina za blokiranje II (1,5 ml; pripravimo dve):

- 0,075 g BSA
- do 1,5 ml detekcijskega pufra II
- premešamo na vorteks mešalu
- shranimo na 4°C

0,1x SSC + 0,1% TritonX-100 (200 ml):

- 1 ml 20x SSC
- do 200 ml DEPC vode
- 200 µl TritonX-100 (Sigma)

1x PBS + 0,1% TritonX-100 (500 ml):

- 50 ml 10x PBS
- do 500 ml DEPC vode
- 500 µl TritonX-100 (Sigma)

Detekcijska raztopina II (500 ml):

- 1 µl Anti-Digoxigenin-AP; Fab fragmenti (Roche) (založna raztopina: 750 U/ml; pred uporabo centrifugiramo 5 min na 14000 obr/min)
- 499 µl raztopine za blokiranje II

AP-substratni pufer III (50 ml):

- 1 ml 5 M NaCl
- 4,6 ml 1 M Tris BASE
- 0,4 ml 1 M Tris HCl
- do 50 ml DEPC vode
- avtoklaviramo

Substratna raztopina III (800 µl; pripravimo dve):

- 16 µl NBT/BCIP
- 784 AP-substratnega pufra III

TNB pufer za blokiranje (100 ml):

- 8,4 ml 1 M Tris HCl
- 1,6 ml 1 M Tris BASE

- 3 ml 5 M NaCl
- 0,5 g reagenta za blokiranje (TSATM Plus DNP (HRP or AP) System, NEN Life Science Products)
- 87 ml DEPC vode
- segrevanje do 60 °C
- razdelimo v več centrifugirk
- shranimo na – 20 °C

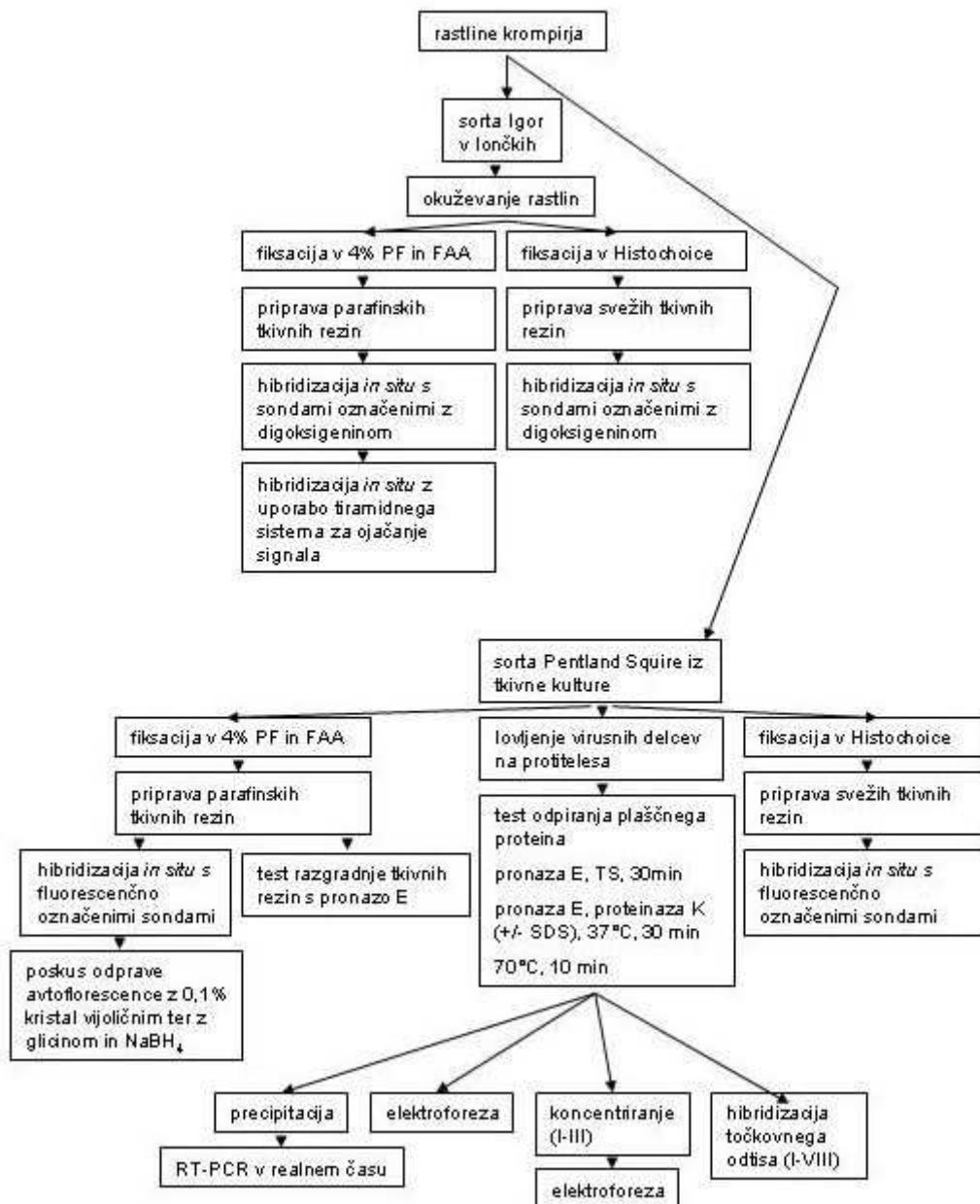
DNP Amplification Reagent (založna raztopina) :

- v DNP Amplification Reagent (TSATM Plus DNP (HRP or AP) System, NEN Life Science Products) dodamo 0,15 ml DMSO (dimetilsulfoksid)
- hranimo najmanj 6 mesecev na 4°C

TNT pufer (120 ml):

- 10,08 ml 1 M Tris HCl
- 1,92 ml 1 M Tris BASE
- 3,6 ml 5 M NaCl
- 0,06 ml Tween 20
- do 120 ml DEPC vode

3.2 Metode



Slika 2: Shematski prikaz uporabljenih metod

3.2.1 Priprava posode

V vseh postopkih smo uporabljali material, ki je bil sterilen in brez RNaz. Vso posodo smo oprali z detergentom Kemex (Kemika), sprali z destilirano vodo in pustili, da se osuši. Stekleno posodo smo pokrili z aluminijasto folijo in jo suho sterilizirali 4h na 200°C. Plastično posodo, pokrovčke, pincete, magnetna mešala smo sterilizirali kemično. Najprej

smo jih sprali s 96% EtOH in jih nato namakali 15 min v 3% H₂O₂. Posodo smo pustili na pladnju s papirjem, da se je osušila. Pri delu smo uporabljali sterilne rokavice brez smukca. Postopke smo priredili po Nikolić (2006).

3.2.2 Okuževanje rastlin krompirja sorte Igor s PVY^{NTN}

Uporabili smo postopek, ki ga uporabljam na NIBu. Okužen rastlinski sok smo pripravili iz štirih okuženih rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture. Iz štirih zdravih rastlin krompirja Pentland Squire iz tkivne kulture smo pripravili rastlinski sok za slepo okuževanje rastlin. Rastlinski material in 0,02 M fosfatni pufer za mehansko inokulacijo smo pripravili v terilnici v razmerju 1:3 (1 g rastlinskega materiala, 3 ml fosfatnega pufra) in strli do tekočine.

Okuževali smo rastline krompirja sorte Igor. Delovno površino smo očistili z etanolom. Lončke z rastlinami smo označili kot okužene (okužili z rastlinskim sokom rastline okužene z virusom PVY (PVY+)), slepe (inokulirali s rastlinskim sokom zdrave rastline (PVY-)) in zdrave (nismo obdelali). Z debelim flomastrom smo označili peclje treh spodnjih zdravih listov. Nato smo jih potresli s karborundom (Prolabo, VWM International). Nadeli smo si rokavice in s prstom namazali rastlinski sok na s karborundom posute liste. Pustili smo delovati 10 minut in s puhalko z navadno vodo sprali rastlinski sok in karborund z lista. Rastline smo odnesli v rastlinjak ter med okužene in neokužene rastline postavili pregrado. Spremljali smo bolezenska znamenja ter znake ranitve in stranja na rastlinah, ter jih fotografirali. Po 12 dneh smo rastline fiksirali.

3.2.3 Fiksacija rastlinskega materiala v 4% PF in FAA

Uporabili smo postopek, ki ga uporabljam na katedri za botaniko. Fiksativa 4% PF s Tritonom X-100 ter FAA smo razporedili po približno 10 ml v stekleničke. Vanje smo nato ločeno razporedili različne dele okuženih in neokuženih rastlin. Odprte stekleničke s tkivom smo dali v eksikator in izčrpali zrak ter pustili 10 minut. Tako se je tkivo v vakuumu degaziralo. Stekleničke smo nato zaprli in jih čez noč shranili v hladilniku.

3.2.4 Dehidracija

Uporabili smo postopek, ki ga uporabljam na katedri za botaniko. Po fiksaciji v PF smo najprej inkubirali 30 min v 30% EtOH in nato še v 50% EtOH. Nato smo vse vzorce (tudi tiste ki so se fiksirali v FAA) dehidrirali v seriji terciarnega butilnega alkohola (TBA), ki smo ga med poskusom segrevali na radiatorju:

- 10 ml TBA, 40 ml 96% EtOH, 50 ml dH₂O (1h, sobna temperatura)
- 20 ml TBA, 50 ml 96% EtOH, 30 ml dH₂O (1h, sobna temperatura)
- 35 ml TBA, 50 ml 96% EtOH, 15 ml dH₂O (1h, sobna temperatura)

- 55 ml TBA, 45 ml 96% EtOH (čez noč, sobna temperatura)
- 75 ml TBA, 25 ml 96% EtOH (1h, sobna temperatura)
- 100 ml TBA (1h, radiator)
- 100 ml TBA (1h, radiator)
- 100 ml TBA (čez noč, v pečici na 56 °C)
- dodali enako količino stopljenega voska (Paraplast plus; Sherwood Medical Co) (čez noč, v pečici na 56 °C)
- 3x na 3-4 ure zamenjali vosek s svežim

3.2.5 Vklapljanje v bloke

Uporabili smo postopek, ki ga uporabljam na katedri za botaniko. Toplo ploščo smo segreli na 68 °C in jo tesno pokrili z aluminijasto folijo ter na njej postavili šotor iz aluminijaste folije (za zadrževanje toplote). Kalupe in pinceto smo segrevali na topli plošči, pinceto pa pred uporabo še segreli na gorilniku. V kalup smo vlili vosek, vanj namestili košček tkiva, postavili na hladno podlago in položili nanj označen plastični nosilec. Po potrebi smo vosek še dolili. Model smo nato dali v ledeno kopel, preden smo vzeli blok iz kalupa pa še za nekaj minut na led. Bloke smo shranili v hladilniku.

3.2.6 Rezanje rezin na mikrotomu

Uporabili smo postopek, ki ga uporabljam na katedri za botaniko. Okrog vklopljenega vzorca smo obrezali vosek v obliki trapezoida ter z rotacijskim mikrotomom (2040 Autocut; Leica Instruments GmbH) narezali 12 µm debele rezine tkiva. Izmed narezanih rezin smo izbrali najlepše in jih razporedili na kapljo DEPC vode na objektnem steklu v dve skupini po 3-9 rezin. Uporabili smo navadna ter s poli-L-lizinom premazana objektna stekla (POLY-PREP™ slides; Sigma-Aldrich). Objektna stekla z rezinami smo pustili čez noč na topli plošči. Rezine smo naslednji dan shranili v škatlo za objektna stekla.

3.2.7 Načrtovanje oligonukleotidnih sond

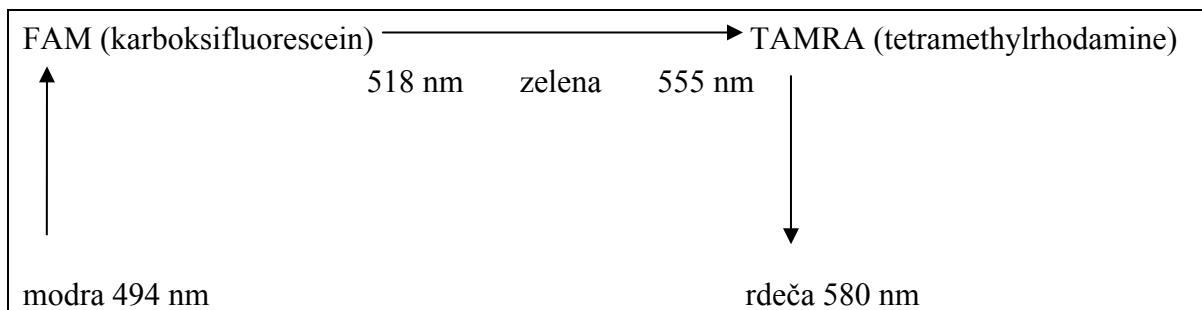
3.2.7.1 Fluorescentno označene sonde

Kot florescentno označene sonde smo uporabili kar sonde za PCR označene s FAM (karboksifluorescein) in TAMRA (tetrametilrodamin).

Preden poteče PCR reakcija sveti TAMRA, saj ta sprejema svetlobo od FAM, katerega spektra ne vidimo. Pri tem sta obe vezani na začetni oligonukleotid. Ko poteče PCR reakcija se TAMRA odcepi, jo speremo in ne sveti več in tako vidimo spekter FAM. pH vpliva na jakost fluorescence FAM. Med pH 7 in 8 je fluorescensa FAM maksimalna, kar

ustreza postopku *in situ* hibridizacije, saj smo uporabili PBS pufer s pH 7,4. Pri višjih koncentracijah sonde se energija prenese v nastanek dimerov.

Ob osvetlitvi z modro ekscitacijsko svetlobo (Slika 3) vidimo zeleno (FAM) in oranžno (TAMRA) obarvanje. Pri osvetljevanju z zeleno ekscitacijsko svetlobo vidimo rdečo (TAMRA). FAM hitro bledi in preparat postaja vedno bolj rdeč (do izraza pride TAMRA, ki je prej svetila oranžno, verjetno zaradi mešanja s FAM svetlobo). Za opazovanje preparatov je tako najbolj primerna osvetlitev z zeleno ekscitacijsko svetlobo, kjer sveti le TAMRA.



Slika 3: Ekscitacijske valovne dolžine fluorescentno označene sonde

3.2.7.2 Z digoksigeninom označene sonde

Podatke o nukleotidnem zaporedju različkov virusa PVY smo dobili v bazi nukleotidnih zaporedij NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Z orodjem za poravnovo več zaporedij smo primerjali nukleotidna zaporedja za plaščni protein različnih sevov PVY. Za načrtovanje specifičnih oligonukleotidnih sond smo uporabili zaporedje gena za plaščni protein na mestih, kjer je med različki malo ali nič odstopanj.

Nukleotidno zaporedje smo odprli v računalniškem programu PrimerExpress™ 2.0 (Applied Biosystems, ZDA). Pogoje in parametre načrtovanja v programu PrimerExpress™ 2.0 smo nastavili na delež GC (40-60%), Tm (nad 60°C) in dolžino oligonukleotidov (optimalna dolžina nad 32bp).

```

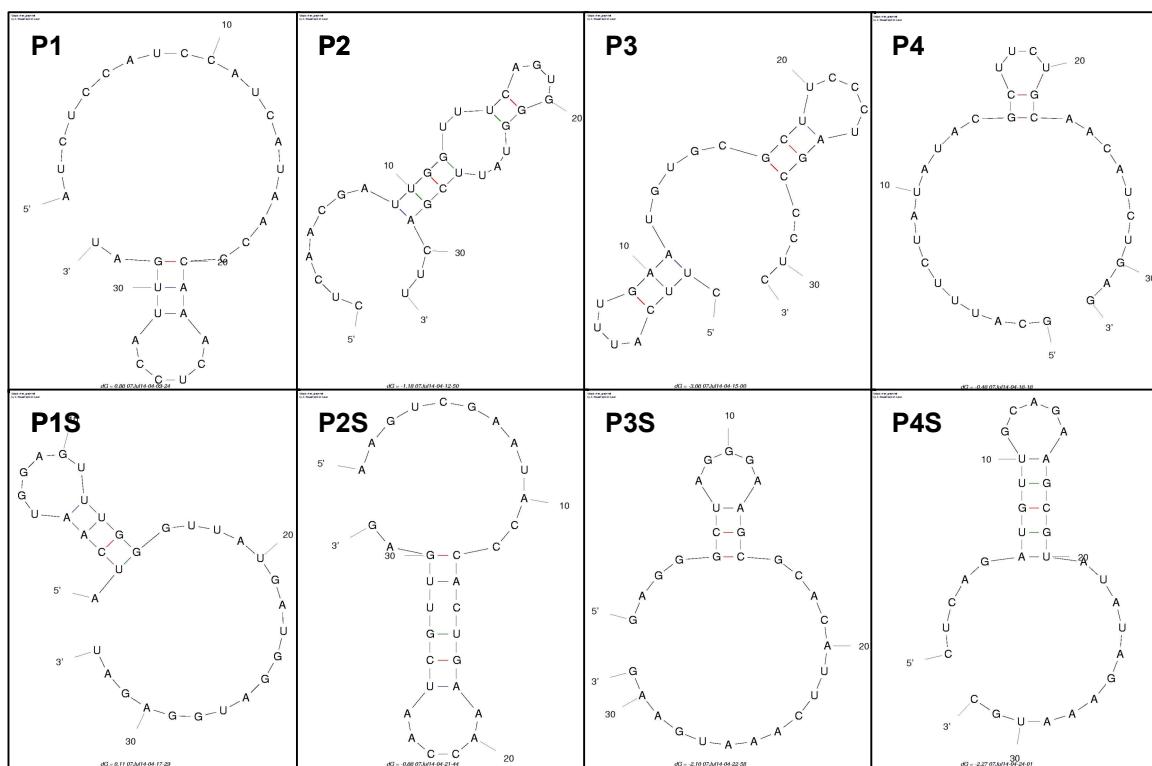
aatgacacaattaatgcaggaggaagcactaagaaggatgaaaacaagagcaaggttagcattcaaccaaat
ctcaacaaggaaaaggagaaggacgtgaatgttggAACATCTGGAACTCTACTGTGCCACGAATTAAAGCTA
TCACGTCAAAATGAGAATGCCAAGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTGGAACACTTACTCGAGTGATGC
TCCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTGATACTGGTGTATGAAGCGGTACAA
CTTGATACGACATAGGAAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTGGCATTGAAAATG
GAACCTGCCAAACATCAACCGAGTTGGTTATGATGGAGATGAACAAAGTCGAATACCCACTGAAACCG
AATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAATCATGGCACATTCTCAGATTTGCGAGCGTATATA
GAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAATGCCACGATATGGTTAGTTGTAATCTGCGCGATGGAAGTTGG
CTCGCTATGCTTTGACTTTGAGGTCACATCACGAACACCGAGTGGGCTAGGAAAGCGCACATTCAAATG
GAAGGCCGAGCATTGAAATCAGCCAACTCTGACTTTGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGGG
AACACAGAGAGGACACCCACCGAGGATGTCCTCCAAGTATGCAACTCTACTTGGAGTCAGAAGATG

```

Slika 4: Nukleotidno zaporedje za plaščni protein virusa PVY

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=14573282>). Z barvami so pobravana vezava mesta protismiselnih sond: rumena-vezavno mesto sonde P1 (sivo - odstopanje v enim nukleotidu), zelena- vezavno mesto sonde P2, modra vezavno mesto sonde P3, roza- vezavno mesto sonde P4

S programom MFOLD (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>) smo preverili, katere od predlaganih sond tvorijo najmanj sekundarnih struktur in dimerov (Slika 5).



Slika 5: Najbolj verjetna struktura oligonukleotidnih sond za virus PVY pri 50 °C dobljena v programu MFOLD (Zuker, 2003 in Walter in sod., 1994; <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1-2.3.cgi>).

S pomočjo orodja BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) smo v podatkovnih bazah vseh znanih genskih bank preverili, če imajo izbrane sonde nepričakovane homologije z rastlinskimi geni.

S programom Geneious smo preverili, kako se sonde vežejo med seboj, v primeru, da bi uporabili mešanice sond.

Izdelali smo protismiselne sonde, ki so komplementarne pozitivni virusni RNA, poleg tega tudi njihove smiselne različice, ki imajo enako zaporedje kot pozitivna virusna RNA.

Sonde, označene z digoksigeninom (Preglednica 3), smo naročili preko spletja pri MWG-Biotech AG (<http://www.mwg-biotech.com>).

Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja uporabljenih sond označenih z digokigeninom in njihove lastnosti.

Oznaka sonde	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Označevalec	Dolžina sonde	GC %	T _m °C
P1	ATCTCCATCCATCATAACCCAAACTCCATTGAT	3'DIG	33	39,4	65,8
P2	CTCAACGATTGGTTTCAGTGGGTATTGACTT	3'DIG	32	43,8	66,9
P3	CTTCATTGAATGTGCGCTTCCCTAGCCCTC	5'DIG	31	51,6	69,5
P4	GCATTCTATATACGCTTCTGCAACATCTGAG	5'DIG	32	40,6	65,6
P1S	ATCAATGGAGTTGGTTATGATGGATGGAGAT	5'DIG	33	39,4	65,8
P2S	AAGTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTGAG	5'DIG	32	43,8	66,9
P3S	GAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAG	3'DIG	31	51,6	69,5
P4S	CTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGC	3'DIG	32	40,6	65,6
LS	AGCCTAACTTGCACGGCTGACATCAACACA	5'DIG	30	50,0	68,1

Založne raztopine sond smo pripravili na naslednji način:

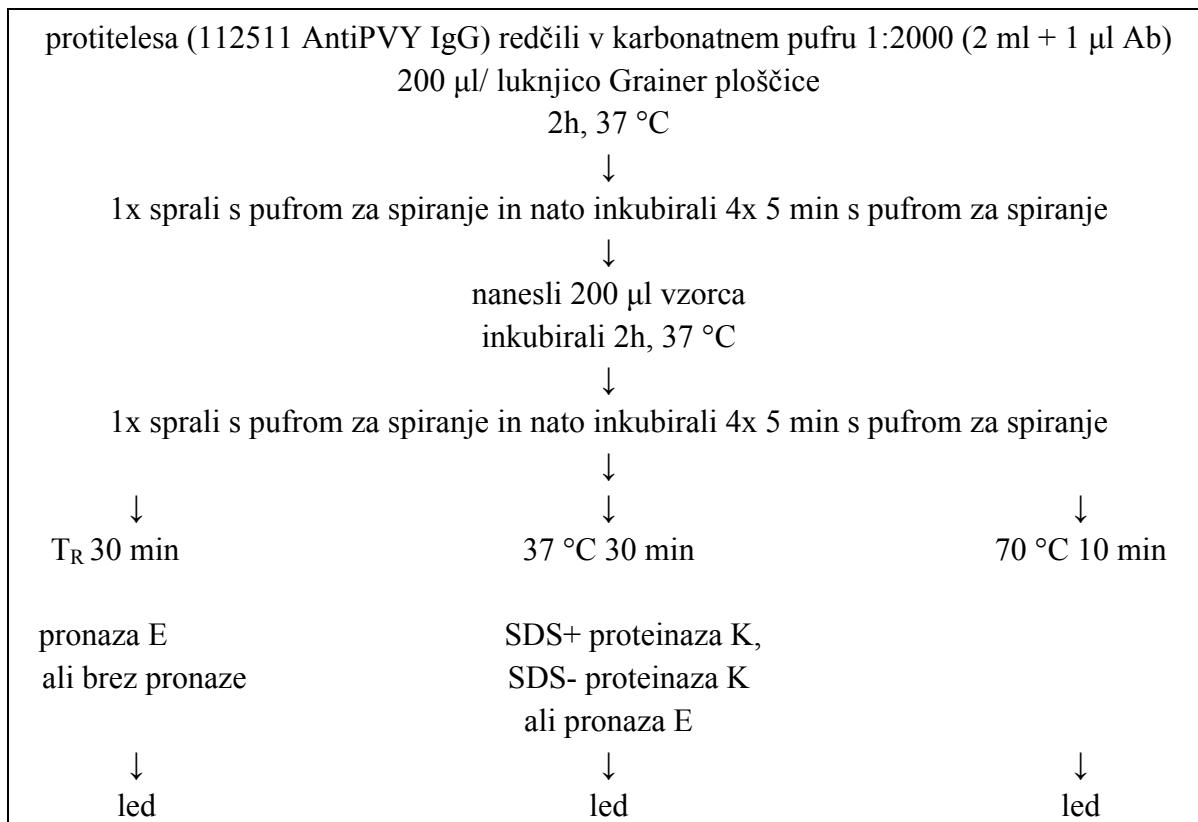
- v epice z liofiliziranimi sondami smo dodali DEPC vode po navodilih, da smo dobili koncentracijo 100 pmol/µl (4000-kratna koncentracija):
 - P1: 316 µl DEPC vode
 - P2: 252 µl DEPC vode
 - P3: 290 µl DEPC vode
 - P4: 283 µl DEPC vode
 - P1S: 268 µl DEPC vode
 - P2S: 216 µl DEPC vode
 - P3S: 285 µl DEPC vode
 - P4S: 86 µl DEPC vode
- založne raztopine smo alikvotirali 3x po 10 µl in shranili v zmrzovalniku
- 50x koncentrirana raztopina sonde 1,25 pmol/µl (800 µl):
 - 10 µl sonde 100pmol/µl
 - 790 µl DEPC vode
- to smo razporedili v manjše epice in shranili v zmrzovalniku

3.2.8 Lovljenje virusnih delcev na protitelesa

Uporabili smo postopek, ki ga uporabljam na NIBu. Da bi preverili, kako različne obdelave vplivajo na virusno RNA in plaščni protein, smo izvedli poskus loviljenja virusnih delcev na protitelesa. Preizkusili smo tretmaje s pronazo E na sobni temperaturi in 37 °C, s proteinazo K z dodanim SDS in brez njega na 37 °C in klasični protokol s precipitacijo in brez na 70 °C.

Priprava vzorca:

- 800 mg rastlinskega materiala
- 2,5 ml ekstrakcijskega pufra
- v vrečki z mrežo (Bioreba) strli z valjčki (IBU, Center za rastlinske tkivne kulture in virologijo)



Slika 6: Postopek loviljenja virusnih delcev na protitelesa in odpiranje plaščnega proteina; na enak način smo obdelali vzorce okuženih in neokuženih rastlin

Vzorce smo shranili v mikrocentrifugirkah čez noč na -80 °C.

Precipitacija RNA

- vsebino vsake epice razpolovili na dve epici po 100 µl

- v vsako dodali 1/10 V 3M Na-acetata in 2,5 V 100% EtOH (Merck)
- v skrinjo na -80 °C za 1 h
- centrifugirali pri 4 °C in 14000 obr/min 30 min
- odstranili supernatant
- dodali 180 µl 70% EtOH
- centrifugirali pri 4 °C in 14000 obr/min 15 min
- odstranili supernatant
- sušili 20 min TR
- dodali 50 µl DEPC vode
- shranili na -80 °C

Elektroforeza

Natehtali smo 0,5 g agaroze (Sigma) in dodali 50 ml 1x TEA. Oboje smo segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agarozna stopila. Raztopljeno agarozo smo ohladili in dodali 1 µl EtBr (etidijev bromid). Agarozo smo zlili v model s pripravljenim glavničkom. Gel se je strdil v 30 minutah. Banjico smo nato napolnili z 1x TEA in vanjo postavili gel. V jamice smo nanesli vzorec in pustili teči elektroforezo 30 min na 200 V.

3.2.9 RT-PCR v realnem času

S kvantitativno analizo s PCR v realnem času smo ugotavljali prisotnost virusov pri različnih tretmajih za odpiranje plaščnega proteina virusa. Pred izvedbo PCR v realnem času smo iz rastlinskih vzorcev izolirali RNA v postopku lovljenja virusnih delcev na protitelesa. Vzorce smo nato obratno prepisali in dobljeno cDNA analizirali s PCR v realnem času.

Za RT-PCR v realnem času smo uporabili kit Brilliant QPCR Core Reagent kit proizvajalca Stratagene. Za 10 µl reakcijo smo uporabili 1 µl Core PCR Buffer, 1,1 µl MgCl₂, 0,4 µl mešanice dNTP-jev, 0,25 µl vsakega oligonukleotidnega začetnika, 0,3 oligonukleotidne sonde in 0,1 µl SureStart Taq DNA polimeraze. Mešanici smo dodali še 0,15 µl referenčnega barvila ROX (redčen 1:50) in 0,4 µl M-MLV reverzne transkriptaze (redčena 1:100) (Promega). Testirali smo po 1 µl vzorčne RNA.

Vse reakcija RT-PCR v realnem času so potekale v reakcijski ploščici s 384 luknjicami v aparatu ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA), z avtomatskim shranjevanjem rezultatov. Za potek reverzne transkripcije so bile reakcijske mešanice najprej inkubirane 30 min na 48 °C. Pomnoževanje v realnem času pa je potekalo 10 min pri 95 °C in 40 ciklov po 1 min pri 60 °C in 15 s pri 95 °C.

Vsek vzorec smo na ploščico nanesli v dveh ponovitvah. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili RNA izolirano iz PVY^{NTN} okuženega krompirja in vodo kot negativno kontrolo reakcije PCR v realnem času (NTC - ang. »no template control«).

3.2.10 Hibridizacija točkovnega odtisa

Z metodo hibridizacije točkovnega odtisa smo želeli preveriti, če se vse sonde vežejo na virusno RNA in katera med njimi se najbolje. Uporabili smo z digoksigeninom označene sonde. Postopek smo sestavili iz različne literature in ga prilagodili našemu poskusu.

3.2.10.1 Hibridizacija točkovnega odtisa I:

Vzorce izoliranih virusnih delcev smo hranili med delom na ledu:

1. 37 °C, PVY-, proteinaza K, z SDS
2. 37 °C, PVY+, proteinaza K, z SDS
3. 37 °C, PVY-, proteinaza K, brez SDS
4. 37 °C, PVY+, proteinaza K, brez SDS
5. 37 °C, PVY-, pronaza E
6. 37 °C, PVY+, pronaza E
7. 37 °C, H₂O, pronaza E
8. sobna temperatura, PVY-, pronaza E
9. sobna temperatura, PVY+, pronaza E
10. sobna temperatura, PVY-, H₂O
11. sobna temperatura, PVY+, H₂O
12. sobna temperatura, H₂O
13. 70 °C, PVY-, neprecipitirana
14. 70 °C, PVY+, neprecipitirana
15. 70 °C, H₂O

Irezali smo najlonsko membrano (Nylon membrane Hybond^{NT}-N, Amersham) v velikosti 91x90 mm in jo razdelili na 7 vrstic (13 mm višina) in 15 stolpcev za različne vzorce (6 mm širina):

- membrano namočili za 10 min v 10x SSC (40 ml) v petrijevki
- osušili na sterilnem filter papirju
- na vsak kvadratek nanesli dvakrat po 1 µl vzorca, vmes počakali da se je točka posušila
- posušili v pečici na 37 °C
- zamreženje 30 s v UV transiluminatorju
- razrezali na trakove za posamezno sondu
- vsak trak dali v svojo 15 ml-centrifugirko napolnjeno s predhibridizacijsko mešanico in inkubirali v hibridizacijski pečici 30 min na 50 °C z vrtenjem

- hibridizacija: v vsako centrifugirko dodali 3,75 µl koncentrirane sonde (inkubirali v pečici 2 h na 50 °C z vrtenjem)
- posthibridizacijska spiranja (inkubirali v pečici 50 °C z vrtenjem):
- 3x 20 min 1x SSC + 0,1% SDS
- 1x 15 min 2x SSC
- blokiranje v raztopini za blokiranje I (v petrijevki, 30 min, na stresalniku, TR)
- detekcijska raztopina I (v petrijevki, 30 min, na stresalniku, TR)
- detekcijski pufer I (v petrijevki, 2x 15 min, na stresalniku, TR)
- AP-substratni pufer I (v petrijevki, 5 min, na stresalniku, TR)
- substratna raztopina I (v petrijevki, čez noč, v temi-zavita v folijo, pri miru)
- sprali z navadno vodo

2 lističa smo namočili še v TEA pufer z EtBr in pogledali na transiluminatorju, da bi preverili, da se vzorci niso sprali.

3.2.10.2 Hibridizacija točkovnega odtisa II

Prvi poskus ni dal pozitivnih rezultatov, zato smo metodo poskušali optimizirati s spremenjenimi časi vezave RNA na membrano s pomočjo UV. Na UV transiluminatorju smo membrano obsevali 0, 1, 3, 5 in 10 min. Hibridizacijo smo pustili teči celo noč.

Uporabili smo neprecipitiran vzorec iz prejšnjega poskusa št. 6: 37 °C, PVY+, pronaza E. Najlonko membrano Nylon membrane Hybond^{NT}-N (Amersham) smo narezali na 6 koščkov. Ponovili smo postopek hibridizacije točkovnega odtisa I, le da smo nanašali 2x 1 µl vzorca. En vzorec, ki smo ga obsevali 5 min smo inkubirali 30 min v TEA pufru z EtBr in pogledali pod UV svetlobo. Čeprav nismo videli ničesar, smo vseeno izvedli celoten postopek hibridizacije. Hibridizirali smo z mešanico sond (P2, P3, P4 in P1S) v pečici čez noč na 50 °C z vrtenjem. Vsake sonde smo v centrifugirko dodali po 3,75 µl. Po hibridizaciji smo spirali (inkubirali v pečici na sobni temperaturi z vrtenjem):

- 2x 5 min 2x SSC, 0,1% SDS
- 2x 15 min 0,2x SSC, 0,1% SDS

Detekcijo smo izvedli na enak način kot pri hibridizaciji točkovnega odtisa I.

3.2.10.3 Hibridizacija točkovnega odtisa III

Da bi dokazali prisotnost RNA v naših vzorcih smo izvedli elektroforezo. Uporabili smo neprecipitiran vzorec. Z elektroforezo smo dokazali prisotnost virusne RNA v naših vzorcih, zato smo hibridizacijo točkovnega odtisa žeeli optimizirati še na druge načine, na primer z daljšim časom hibridizacije.

Zopet smo izrezali najlonско membrano Nylon membrane Hybond^{NT}-N (Amersham) v velikosti 15x90 mm (membrana je širša, da se ne premika v 15 ml-centrifugirki) in jo razdelili na 5 delov (15x18 mm):

- na vsak kvadratek nanesli 5x 2 µl vzorca, vmes posušili na 80 °C
- posušili na 80 °C, 30 min
- membrano, ovito v folijo za živila in obrnjeno navzdol, smo obsevali 5 min v UV transiluminatorju
- dali v 15 ml-centrifugirko napolnjeno s predhibridizacijsko mešanico I in inkubirali v pečici 2 h na 55 °C z vrtenjem
- hibridizacija: v vsako centrifugirko dodamo 3,75 µl vsake sonde: PSS, P2S, P3S - te sonde smo izbrali, ker se najmanj verjetno vežejo med sabo, kar smo preverili v programu Geneious
- inkubirali v pečici 44 h na 55 °C z vrtenjem
- posthibridizacijska spiranja (na sobni temperaturi z vrtenjem):
 - 2x 5 min 2x SSC, 0,1% SDS
 - 2x 5 min 0,2x SSC, 0,1% SDS

Detekcijo smo izvedli na enak način kot pri hibridizaciji točkovnega odtisa I, le da smo pustili membrano v substratni raztopini I tri dni.

3.2.10.4 Koncentriranje virusne RNA:

Ker noben od poskusov hibridizacije točkovnega odtisa ni dal pozitivnih rezultatov smo sklepali, da je virusna RNA v premajhni koncentraciji in bi jo bilo potrebno skoncentrirati.

3.2.10.4.1 Koncentriranje I

Postopek smo izvedli po protokolu »RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup« iz RNeasy Mini Handbook (06/2001).

- po 150 µl dveh vzorcev pripravljenih z lovljenjem virusnih delcev na protitelesa odpipetirali v novo epico
- dodali 800 µl RLT pufra (litični pufer) in 400 µl 100% etanola, premešali
- 700 µl mešanice nanesli v RNeasy Mini Elute Spin Column, v kolekcijski epici centrifugirali 30 s na 13000 obr/min
- prestavili v nove mikrocentrifugirke, stare s tekočino zavrgli
- še enkrat dodali 700 µl mešanice
- centrifugirali 30 s 13000 obr/min
- v nove epice, stare zavrgli
- dodali 500 µl »RPE Wash« pufra
- centrifugirali 30 s na 13000 obr/min
- prestavili v nove epice, stare zavrgli
- dodali 500 µl RPE Wash pufra

- centrifugirali 2 min na 13000 obr/min
- stare epice zavrgli, dali v nove in centrifugirali prazne 1 min na 13000 obr/min
- stare epice zavrgli, dali nove s pokrovčki
- dodali 30 µl »RNase free water«
- centrifugirali 1 min na 13000 obr/min
- zaprli epice, kolone zavrgli
- prisotnost RNA preverili z elektroforezo.

3.2.10.4.2 Koncentriranje II

Postopek smo izvedli po protokolu RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup iz Rneasy Mini Handbook (06/2001).

- dva vzorca z lovljenjem virusnih delcev na protitelesa združili in dopolnili z vodo brez RNaz do končne prostornine 200 µl
- dodali 350 µl RLT pufra (litični pufer), zmešali
- dodali 250 µl 100% etanola, zmešali s pipetiranjem
- 700 µl vzorca dali v RNeasy Mini Elute Spin Column, v kolekcijski epici
- centrifugirali 30 s 13000 obr/min
- prestavili v nove epice, stare s tekočino zavrgli
- še enkrat dodali 500 µl pufra RPE v kolono
- centrifugirali 30 s 13000 obr/min
- prestavili v nove epice, stare zavrgli
- dodali 500 µl 80% etanola
- centrifugirali 5 min na 13000 obr/min
- prestavili v nove 1,5 ml epice, stare zavrgli
- dodali 14 µl »RNaze free water« v sredino kolone
- centrifugirali 1 min na 13000 obr/min
- zaprli epice, kolone zavrgli
- prisotnost RNA preverili z elektroforezo.

3.2.10.4.3 Koncentriranje III

Zaradi suma, da se je vsa RNA v vzorcih razgradila smo izvedli lovljenje virusnih delcev na protitelesa in ponovili koncentriranje virusne RNA s precipitacijo. Izvedli smo postopek opisan v poglavju 3.2.8, prilagojen za 500 µl vzorca

3.2.10.5 Hibridizacija točkovnega odtisa IV

Tokrat smo protokol priredili po Kogovšek (2004). Izrezali smo najlonско membrano Nylon membrane Hybond^{NT}-N (Amersham) v velikosti 13x90 mm in jo razdelili na 5 stolpcov za različne vzorce:

- membrano omočili v DEPC vodi v petrijevki
- membrano namočili za 5 min v 20 x SSC v petrijevki
- na vsak kvadratek nanesli 2x 1µl vzorca, vmes posušili
- posušili v pečici na 37 °C (približno 5 min)
- obsevamo zavito v folijo za živila obrnjeno navzdol 4 min v UV transiluminatorju
- trak dali v 15 ml centrifugirko napolnjeno s predhibridizacijsko mešanico II in inkubirali v hibridizacijski pečici 1 h na 50 °C z vrtenjem
- hibridizacija: v vsako centrifugirko dodamo 1,5 µl vsake izmed naslednjih sond: P2, P3, P1S
- inkubirali v pečici čez noč na 50 °C z vrtenjem
- posthibridizacijska spiranja (v pečici 50 °C z vrtenjem):
- 2x 5 min 2x SSC + 0,1% SDS
- 2x 15 min 0,5x SSC + 0,1% SDS
- 1 min v pufru maleinske kisline + 0,3% Tween 20
- 60 min blokiranje v 1% reagentu za blokiranje, pri sobni temperaturi in rotiranju
- dodali 3 µl AntiDIG-AP (1:5000) in inkubirali 30 min pri sobni temperaturi z vrtenjem
- 2x 15 min spirali v pufru maleinske kisline + 0,3% Tween 20
- 5 min inkubiramo v AP-substratnem pufru II pri sobni temperaturi z vrtenjem
- substratna raztopina II (2 h , v temi, zavita v folijo, pri miru)
- sprali z navadno vodo

3.2.10.6 Hibridizacija točkovnega odtisa V

Ponovili smo postopek, tokrat z vsako sondou posebej, da bi ugotovili, katera sonda se najbolje veže na virusno RNA.

Irezali smo najlonško membrano Nylon membrane Hybond^{NT}-N (Amersham) v velikosti 72x135 mm in jo razdelili na 4 stolpce in 9 vrstic(15x18 mm).

Postopek smo ponovili, tokrat za vsako sondou posebej, katere smo dali po 3 µl (koncentracija) v 15 ml hibridizacijske mešanice. Uporabili smo sonde: P1, P2, P3, P4, P1S, P2S, P3S, P4S, LS. Kot vzorce pa smo poleg skoncentriranih vzorcev kot pozitivno kontrolo uporabili z »RNA Easy« izolirano celokupno RNA iz rastline krompirja okužene s PVY virusom in kot negativno kontrolo izolirano celokupno RNA iz neokužene rastline krompirja.

3.2.10.7 Hibridizacija točkovnega odtisa VI

Z naslednjim poskusom smo želeli preveriti, če je v iztisnjeni kapljici soka dovolj virusa, da ga lahko zaznamo s hibridizacijo točkovnega odtisa.

Irezali smo najlonsko membrano Nylon membrane Hybond^{NT}-N (Amersham) v velikosti 60x90 mm in jo razdelili na 8 stolpcev in 4 vrstice (11,25x15 mm).

V terilnici smo strli dve rastlini s PVY okuženega krompirja in ločeno dve rastlini neokuženega krompirja. Rastlinski sok smo nalili v epice in centrifugirali 15 s da so se večji delci posedli. Pronazo E smo pustili delovati 15 minut.

Ponovili smo postopek hibridizacije točkovnega odtisa IV s sondami: P2, P3, P3S, LS.

3.2.10.8 Hibridizacija točkovnega odtisa VII oz odtis tkiva:

Z metodo odtisa tkiva (»tissue printing«) smo želeli preveriti, če v tem primeru ne dobimo sledov rastlinskih barvil na membrani, ki zakrijejo signal hibridizacije.

Irezali smo najlonsko membrano Nylon membrane Hybond^{NT}-N (Amersham) v velikosti 30x90 mm in jo razdelili na 7 stolpcev in 2 vrstici (12x15 mm). S PVY okuženo in neokuženo rastlino smo narezali na 3 prečne rezine stebla, 2 prečni rezini peclja in 1 vzdolžno rezino stebla. S pomočjo papirnate brisače smo rezine nežno odtisnili na membrano in držali približno 1 minuto. Rezine smo dali nato na petrijevko in slikali pod lupo. Postopek hibridizacije točkovnega odtisa IV smo zopet ponovili.

3.2.11 Hibridizacija *in situ*

3.2.11.1 Test delne razgradnje rezin s pronazo E

Protokol smo pripredili po Nikolić (2006). Preparate smo rehidrirali v etanolni vrsti za rehidracijo parafinskih rezin.

Permeabilizacija s pronazo E:

- 100 mM TrisHCl (pH 7,6) 5 min
- stekelca smo popivnali, da med sklopi rezin ni bilo tekočine
- sklope rezin smo občrtali s hidrofobnim pisalom (»Liquid blocker super Pap-pen, Daido Sangyo C.«)
- na vsak sklop smo nanesli 200 µl pronaze E v različnih koncentracijah in pustili na preparatih različen čas
- vzdolžne rezine stebla in prečne rezine lista in peclja krompirja fiksiranega v FAA (12 µm) smo obdelali:
 - 15 min na sobni temperaturi (kontrola, 125 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml)
 - 30 min na sobni temperaturi (kontrola, 125 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml)
 - 15 min na 37°C (125 µg/ml, 500 µg/ml)
 - 30 min na 37°C (125 µg/ml, 500 µg/ml)

- glicin (0,2% v 1x PBS) 2 min
- 1x PBS 5 min
- preparate smo odcedili na papirju
- na vsak sklop smo nanesli 200 µl 4% PF 10 min
- dH₂O 3x3 min
- na vsak sklop smo nanesli kapljico Gel-mount-a (Sigma) in preparate pokrili s krovnimi stekli
- preparate smo opazovali pod mikroskopom in jih slikali

3.2.11.2 Hibridizacija s fluorescentnimi sondami

3.2.11.2.1 Hibridizacija *in situ* na parafinskih rezinah s fluorescentno označenimi sondami

Predhibridizacijske stopnje postopka smo pripredili po Nikolić (2006). Preparate smo rehidrirali v etanolni vrsti za rehidracijo parafinskih rezin. Ponovili smo postopek permeabilizacije iz poglavja 3.2.11.1, le da smo na koncu sprali 3-krat po 3 minute z 1x PBS.

Acetilacija:

- 0,1 M trietanolamin, po dve stekelci v sterilno centrifugirko z magnetnim mešalom, vmes dali 1 ml-nastavek za pipeto
- dodali 150 µl anhidrid ocetne kisline (končna koncentracija 0,5%)
- inkubacija s stalnim mešanjem 10 min
- 1x PBS 5 min

Inkubacija v predhibridizacijskem pufru:

- na vsak sklop nanesli 200 µl predhibridizacijske mešanice III
- inkubacija 1h v vlažni komori na 60 °C v pečici

Hibridizacija (delamo pri šibkejši svetlobi):

- priprava hibridizacijske mešanice:
- 8 µl 5 µM sonde
- 200 µl predhibridizacijske mešanice III
- odcedili stekelca
- na en sklop na objektnem steklu nanesli 50 µl hibridizacijske mešanice, na drug pa 50 µl predhibridizacijske mešanice (kontrola)
- vsak sklop pokrili s Parafilmom M (Laboratory film, Pechiney plastic packaging)
- stekelca dali v hibridizacijski komori (Hybchamber; GeneMachines)
- v vsak kanal hibridizacijske komore dali 40 µl 10x SSC
- komori zatesnili
- inkubacija čez noč (20 h) v vodni kopeli na 50°C

V zatemnjeni sobi smo iz vodne kopeli vzeli hibridizacijski komori, ju odprli, preparate prekrili z 1x PBS, da je parafilm odstopil. Sledilo je 3x 3 min spiranje v 1x PBS. Preparate smo pregledali in fotografirali z AxioImager Z1 mikroskopom (Carl Zeiss, Nemčija) v povezavi z računalniškim programom za zajem slik (AxioVision 4.4, Carl Zeiss) s pomočjo kamere AxioCam HRc (Carl Zeiss Vision). Za ekscitacijo fluorokromov smo uporabili moder filter (Filter Set 09, Carl Zeiss) z valovno dolžino eksitacije 450 nm in valovno dolžino emisije 515 nm ter zelen filter (Filter Set 15, Carl Zeiss) z eksitacijo 546 nm in emisijo 590 nm.

3.2.11.2.2 Hibridizacija *in situ* na svežih rezinah s fluorescentno označenimi sondami

Postopek smo priredili po Borlido in sod. (2002). Okužene in neokužene rastline krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture smo razrezali na liste s delom steba, pecelj z delom steba, list s pecljem del lista z delom peclja in jih fiksirali v štirih centrifugirkah z 20 ml vsakega fiksativa. Po fiksaciji smo 3x sprali v 20 ml 1x PBS.

S pomočjo britvice in stiropora smo narezali rezine steba peclja in lista ter jih dali v mikrotitersko ploščo s 96 luknjami (Falcon, Bencon Dickinson) z ravnim dnem v 100 µl 1x PBS. V ostale luknjice v okolini smo dali 2x SSC za ohranjanje vlažnosti.

1x PBS v luknjicah smo nato odpipetirali in nadomestili s prehibridizacijsko mešanico IV. Ploščo smo prekrili z dvema plastema parafilma in jo dali v pečico na 50 °C za 1 uro. Pufer smo nato odpipetirali in dodali 100 µl hibridizacijske mešanice IV v vsako luknjico.

Ploščo smo zopet pokrili z dvema plastema parafilma in jih ovili v aluminijasto folijo, ker je sonda svetlobno občutljiva. Hibridizacija je potekala 18 ur na 50 °C.

Naslednji dan je sledilo 3x 10 min spiranje v 1 ml 1x PBS. Koščke tkiva smo nato položili na objektna stekla in opazovali na ApoTome mikroskopu z zeleno in modro eksitacijsko svetlobo.

3.2.11.2.3 Poskus odprave avtofluorescence

Preparate smo rehidrirali v naslednji vrsti snovi (40 ml) v Coplinovih posodah:

- ksilen 10 min
- ksilen 10 min
- 100% EtOH 3min
- 90% EtOH 3 min
- 70% EtOH 3min
- 30%EtOH 3 min
- dH₂O 3 min

Med vsako prestavitevijo preparate odcedili na papirnatih brisači.

Preparate smo obdelali po postopku Dreja (2006) in »Autofluorescence: Causes and cures« (<http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/PDF/Autofluorescence.pdf>)

3.2.11.2.3.1 Barvanje s kristal vijoličnim

Na en sklop rezin smo kanili nekaj kapljic dH₂O, na drug pa 0,1% kristal vijolično. Kristal vijolično smo pustili delovati 20s, 1 min, 2 min ali 5 min. Preparate smo pogledali pod mikroskopom z zeleno in modro ekscitacijsko svetlogo.

3.2.11.2.3.2 Glicin in NaBH₄

Stekelca z rezinami smo obdelali po naslednjem postopku:

- stekelce 4 smo dali v 50 mM NH4Cl (0,134 g/ 50 ml) v 1x PBS (15 min, TR)
- 100 mM (0,75%) glicin (0,30028g/40 ml) v 1x PBS (5 min, TR)
- stekelce 4 in tokrat še stekelce 3 smo dali v 0,1% NaBH₄ (0,1 g/100ml) v PBS (2x5 min, na ledu)
- 0,15 M etanolamin (0,895g v 40 ml destilirane vode) (5 min)
- dH₂O.

Stekelce 2 je bilo kontrola.

3.2.11.3 Hibridizacija z digoksigeninom označenimi sondami

3.2.11.3.1 Hibridizacija *in situ* na parafinskih rezinah s sondami označenimi z digoksigeninom

Postopek smo priredili po Nikolić (2006). Za poskus smo izbrali vzorce listnega peclja listov PVY+ rastlin nad okuženim delom, fiksirane v FAA.

Preparate smo rehidrirali v etanolni vrsti za rehidracijo parafinskih rezin. Ponovili smo postopke permeabilizacije, acetilacije in inkubacije v predhibridizacijskem pufru, iz poglavja 3.2.11.2.1.

Hibridizacija:

- priprava hibridizacijske mešanice:
- 2 µl vsake sonde
- 48 µl predhibridizacijskega pufra
- odcedili stekelca po predhibridizaciji
- na sklop rezin na objektnem steklu nanesli 50 µl hibridizacijske mešanice s sondo (P1, P2, PS ali LS)
- vsak sklop pokrili s krovnikom iz parafilma
- stekelca dali v hibridizacijsko komoro
- v vsak kanal hibridizacijske komore dali 40 µl 10x SSC
- komori zatesnili
- inkubacija čez noč (20 h) v vodni kopeli na 50°C

Posthibridizacijska spiranja:

- 2 Coplinovi posodi napoljeni z 0,1x SSC + 0,1% TritonX-100 dali 15 min pred koncem hibridizacije za 15 min v vodno kopel
- preparate smo prekrili z 2x SSC, da je parafilm odstopil
- 2x 15 min spiranje v 0,1x SSC + 0,1% TritonX-100 v vodni kopeli, da se sonda ne veže ponovno

Kolorimetrična detekcija hibridiziranih mest z alkalno fosfatazo:

- detekcijski pufer 5 min
- na vsak sklop smo nanesli 200 µl raztopine za blokiranje II, ki smo jo pred tem premešali
- inkubacija v vlažni komori na sobni temperaturi 30 min
- stekelca odcedili
- na vsak sklop smo nanesli 50 µl detekcijske raztopine II in inkubirali v vlažni komori na sobni temperaturi 1h
- 3x 10 min spiranje v detekcijskem pufru II
- AP-substratni pufer III 5 min
- na vsak sklop smo nanesli 200 µl substratne raztopine III in inkubirali v vlažni komori v temi na sobni temperaturi 2h
- spirali pod pipo z navadno vodo 3 min

Za pripravo trajnih preparatov smo jih najprej rehidrirali v naslednji seriji raztopin:

- 30% EtOH 1 min
- 70% EtOH 1 min
- 100% EtOH 1 min
- ksilen 2x 5 min
- Permount, krovno steklo

Priprava navadnega preparata (z namenom: preveriti nespecifično barvanje s substratom NBT/BCIP):

- ksilen 2x 5 min
- 100% EtOH 2 min
- 70% EtOH 2 min
- 30% EtOH 2 min
- dH₂O 2 min
- preparate smo pregledali in jih fotografirali z mikroskopom Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Nemčija).
- na vsak sklop smo nanesli 200 µl substratne raztopine III in inkubirali v vlažni komori v temi na sobni temperaturi 2h
- spiranje pod pipo z navadno vodo 3 min.

3.2.11.3.2 Hibridizacija *in situ* z uporabo tiramidnega sistema za ojačanje signala

Postopek smo priredili po TSATM Plus DNP (HRP or AP) System (2007) Preparate smo rehidrirali v etanolni vrsti za rehydracijo parafinskih rezin. Ponovili smo postopke permeabilizacije, acetilacije, predhibridizacije, hibridizacije in spiranja iz poglavja 3.2.11.3.1. Uporabili smo sonde: P1, P3, P1S in LS.

Blokirali smo z TNB pufom za blokiranje, na vsak sklop rezin smo nanesli 100 µl in inkubirali v vlažni komori 30 minut pri sobni temperaturi.

Detekcija z anti-DIG-HRP protitelesi:

- v anti-DIG-HRP (Roche) liofilizat dodali 1 ml ddH₂O
- anti-DIG-HRP redčili 1:100 v TNB pufu za blokiranje (8 µl anti-DIG-HRP, 792 µl TNB pufra za blokiranje)
- na vsak sklop nanesli 100 µl anti-DIG-HRP redčine in inkubirali v vlažni komori 30 minut na sobni temperaturi
- sprali 3 x 15 min v TNT pufu na stresalniku pri sobni temperaturi

TSA Plus DNP pomnoževanje:

- DNP Amplification Reagent (založno raztopino) (TSATM Plus DNP (HRP or AP) System, NEN Life Science Products) redčili 1:50 z 1 x Plus Amplification Dilutet (TSATM Plus DNP (HRP or AP) System, NEN Life Science Products) (16 µl DNP Amplification Reagent (založno raztopino), 784 µl TNB 1 x Plus Amplification Dilute)
- na vsak sklop nanesli 100 µl redčine DNP Amplification Reagent in inkubirali na sobni temperaturi 3-10 minut
- sprali 3 x 5 min v TNT pufu na stresalniku pri sobni temperaturi

Vizualizacija odloženega DNP:

- anti-DNP-AP (TSATM Plus DNP (HRP or AP) System, NEN Life Science Products) redčili 1:100 v TNB pufu za blokiranje (8 µl anti-DNP-AP, 792 µl TNB pufra za blokiranje)
- na vsak sklop nanesli 100 µl anti-DNP-AP redčine in inkubirali v vlažni komori 30 minut na sobni temperaturi
- sprali 3 x 5 min v TNT pufu na stresalniku pri sobni temperaturi
- na vsak sklop nanesli 200 µl substratne raztopine III in inkubirali v vlažni komori v temi pri sobni temperaturi 25 minut

3.2.11.3.3 Hibridizacija *in situ* na svežih rezinah s sondami označenimi z digoksigeninom

Postopek smo priredili po Borlido in sod. (2002). Rastlinski material smo s pomočjo stiroporja in žiletke razrezali na rezine steba, peclja in lista ter jih 1h fiksirali v fiksativu Histochoice. Po fiksaciji smo 3x sprali v 10 ml 1x PBS.

Rezine smo razporedili v mikrotitersko ploščo in dodali po 100 µl predhibridizacijske mešanice III. V okoliške luknje smo dali enako količino 2x SSC.

Ploščo smo prekrili z dvema plastema parafilma in jih dali v vodno kopel na 60°C za 1 uro. Predhibridizacijski mešanico III smo nato odpipetirali in dodali 100 µl hibridizacijske mešanice v vsako luknjico. Mešanico smo pripravili iz:

- 4 µl sonde (koncentracija 1,25 pmol/ µl)
- 96 µl predhibridizacijske mešanice

Uporabili smo sonde P1, P2, P3, P4, LS (končna koncentracija sonde 0,05 pmol/µl). Ploščo smo zopet pokrili s tremi plastmi parafilma. Hibridizacija je potekala 18 ur na 50°C v vodni kopeli. Naslednji dan je sledilo 3x 10min spiranje v 5 ml 1x PBS + TritonX-100 v posodah s 6 luknjami z občasnim mešanjem. Sledilo je še spiranje 5 min v 1x PBS.

Kolorimetrična detekcija hibridiziranih mest z alkalno fosfatazo:

- detekcijski pufer 5 min
- rezine prenesli v mikrotitersko ploščo, dodali 100 µl raztopine za blokiranje II, ki smo jo pred tem premešali
- inkubacija v vlažni komori (pokrito s parafilmom) na sobni temperaturi 30 min
- v vsako luknjo dali 100 µl detekcijske raztopine II (Anti-DIG protitelesa) in inkubirali v vlažni komori na sobni temperaturi 1h
- 3x 10 min spirali v detekcijskem pufru II
- AP-substratni pufer III 5 min
- v vsako luknjo dali 100 µl substratne raztopine III in inkubirali v vlažni komori v temi na sobni temperaturi 2h
- spirali z navadno vodo 10 min
- Rezine smo spirali v plošči s 6 večjimi luknjami, inkubirali pa v plošči s 96 luknjami.

Koščke tkiva smo nato položili na objektna stekla in opazovali pod mikroskopom.

4 REZULTATI

4.1 Okuževanje rastlin krompirja sorte Igor s PVY^{NTN}

Rastline krompirja sorte Igor stare 28 dni (mlade) in 37 dni (stare) smo okužili z rastlinskim sokom rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture okuženih z virusom PVY^{NTN}. Za kontrolo smo rastline inokulirali z rastlinskim sokom zdravih rastlin. Pet dni in dvanajst dni po okužbi smo okužene rastline pregledali in opisali bolezenska znamenja ter jih fotografirali.

Pet dni po okužbi se virus še ni razširil na neokužene dele rastline, saj neokuženi listi niso kazali bolezenskih znamenj. Po dvanajstih dneh se je pri eni rastlini na neokuženih listih pojavil mozaični vzorec (Slika 7), kar je znak sistemске okužbe z virusom PVY. Rastlino z najbolj izraženimi bolezenskimi znamenji smo fiksirali, kot kontrolo smo izbrali slepo inokulirano rastlino brez bolezenskih znamenj (Preglednica 4, Preglednica 5).

Preglednica 4: Opis bolezenskih znamenj in znakov ranitve in staranja rastlin krompirja sorte Igor 5 dni po okužbi: mlade rastline (na dan okuževanja stare 28 dni), stare rastline (na dan okuževanja stare 37 dni); okužene (rastline krompirja sorte Igor okužene z rastlinskim sokom rastline krompirja sorte Pentland Squire okužene z virusom PVY^{NTN}); slepe (rastline krompirja sorte Igor inokulirane z rastlinskim sokom zdrave rastline krompirja sorte Pentland Squire); zdrave (neobdelane rastline krompirja sorte Igor).

5 dni po okužbi	1 mlada	2 mlada	3 stara	4 stara
okužene (PVY+)	od treh okuženih listov sta 2 odpadla (posušena), 1 ima nekroze	od treh okuženih listov sta 2 odpadla (posušena), 1 ima nekroze	vsi trije okuženi listi so odpadli	od treh okuženih listov je 1 odpadel
	neokuženi listi so normalni	neokuženi listi so normalni	neokuženi listi so normalni, le na enim je nekrozna pika	neokuženi listi so normalni
slepe (PVY-)	vsi trije inokulirani listi so odpadli	od treh inokuliranih listov sta 2 odpadla	od dveh inokuliranih listov je 1 odpadel, 1 je normalen, le na koncu lista ima nekrozo	od treh inokuliranih listov je 1 odpadel, 1 klorozo, 1 ima nekrozo
	od neinokuliranih listov ima 1 kloroze	od neinokuliranih listov ima 1 kloroze	neinokulirani listi so normalni	od neinokuliranih listov ima 1 nekroze
zdrave	/	/	nekroza na koncu listov	nekroza na koncu listov

Preglednica 5: Opis bolezenskih znamenj in znakov ranitve in staranja rastlin krompirja sorte Igor 12 dni po okužbi: mlade rastline (na dan okuževanja stare 28 dni), stare rastline (na dan okuževanja stare 37 dni); okužene (rastline krompirja sorte Igor okužene z rastlinskim sokom rastline krompirja sorte Pentland Squire okužene z virusom PVY^{NTN}); slepe (rastline krompirja sorte Igor inokulirane z rastlinskim sokom zdrave rastline krompirja sorte Pentland Squire); zdrave (neobdelane rastline krompirja sorte Igor).

12 dni po okužbi	1 mlada	2 mlada	3 stara	4 stara
okužene (PVY+)	vsi trije okuženi listi so odpadli neokuženi listi imajo mozaični vzorec (kloroze)	vsi trije okuženi listi so odpadli neokuženi listi so normalni	vsi trije okuženi listi so odpadli neokuženi listi imajo rahlo klorozo	vsi trije okuženi listi so odpadli neokuženi listi so normalni
	to rastlino smo fiksirali			
slepe (PVY-)	vsi trije inokulirani listi so odpadli neinokulirani listi imajo na konicah listov nekroze	vsi trije inokulirani listi so odpadli neinokulirani listi imajo na konicah listov nekroze	od dveh inokuliranih listov je 1 odpadel, 1 je rumen (kloriza) in na konici lista ima nekrozo	od treh inokuliranih listov sta 2 odpadla, 1 ima nekrozo na konici lista od neinokuliranih listov ima 1 nekroze
	to rastlino smo fiksirali			
zdrave	/	/	od označenih 3 listov je en odpadel, 2 sta rahlo rumena	od označenih 3 listov je en odpadel, 2 sta rahlo rumena z nekrozo na konici listov



Slika 7: Mozaični vzorec na rastlini krompirja sorte Igor iz rastlinjaka okužene z rastlinskim sokom rastline krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture okužene z virusom PVY^{NTN}.

4.2 Izolacija virusnih delcev in odpiranje plaščnih proteinov virusa PVY

Vzorce smo obratno prepisali in dobljeno cDNA analizirali s PCR v realnem času. Izvedli smo RT-PCR v realnem času, da bi preverili s katerim postopkom najbolje odpremo plaščne proteine virusov PVY. Rezultati so pokazali, da je najbolj učinkovita metoda za odprtje plaščnih proteinov razgradnja s pronazo E, 30 minut na sobni temperaturi. Pri vzorcu neokužene rastline obdelane s pronazo E na 37 °C je prišlo do kontaminacije, saj je pri vseh drugih kontrolah ni prisotnega virusa PVY (Preglednica 6).

Preglednica 6: Rezultati RT-PCR v realnem času (kit Brilliant QPCR Core Reagent kit, Stratagene).

Vzorec	število ciklov
negativna kontrola	nedoločljivo
reakcije	nedoločljivo
37 °C, PVY-, proteinaza K, z SDS	nedoločljivo
37 °C, PVY+, proteinaza K, z SDS	26,68527 27,16439

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Vzorec	število ciklov
37 °C, PVY-, proteinaza K, brez SDS	nedoločljivo
37 °C, PVY+, proteinaza K, brez SDS	25,22844 22,59769
37 °C, PVY-, pronaza E	nedoločljivo
37 °C, PVY+, pronaza E	21,44624 21,42705
37 °C, PVY -, pronaza E	32,76881 32,77727
sobna temperatura, PVY-, pronaza E	nedoločljivo
sobna temperatura, PVY+, pronaza E	20,72907 20,64473
sobna temperatura, PVY-, H2O	nedoločljivo 39,05806
sobna temperatura, PVY+, H2O	29,42639 29,84149
sobna temperatura, H2O	nedoločljivo
70 °C, PVY-, precipitirano	nedoločljivo
70 °C, PVY+, precipitirano	27,97696 27,63926
70 °C, PVY-, neprecipitirano	nedoločljivo
70 °C, PVY+, neprecipitirano	24,33164 24,32991
70 °C, H2O	nedoločljivo
negativna kontrola reakcije	nedoločljivo

4.3 Test sond – hibridizacija točkovnega odtisa

S poskusom hibridizacije točkovnega odtisa smo želeli preveriti, če se izbrane oligonukleotidne sonde (glej Metode) vežejo na virusno RNA in pri kateri izmed njih dobimo najmočnejši signal.

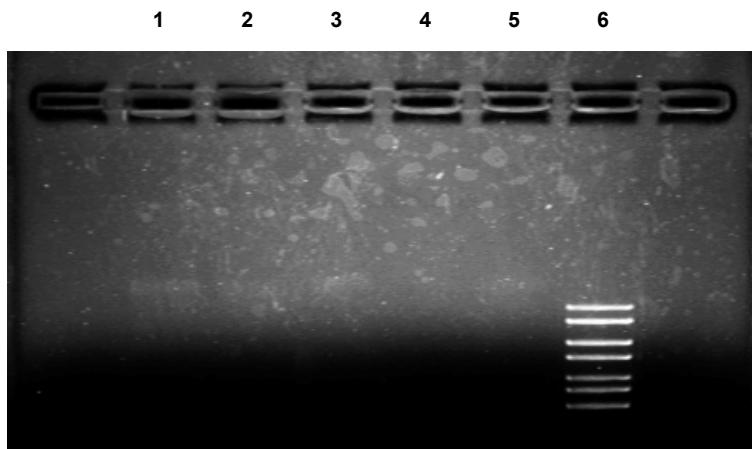
Do obarvanja ni prišlo nikjer na membrani. 2 lističa smo namočili še v pufer z EtBr in pogledali na transiluminatorju, da bi preverili, da se vzorci niso sprali. Namočili smo listič brez sonde in listič s sondijo P3. Pri prvem je bilo opaziti le neobdelan vzorec neokužene rastline, na drugem pa ničesar.

Ker prvi poskus ni dal pozitivnih rezultatov, smo metodo poskušali optimizirati s spremenjenimi časi obsevanja membran na UV transiluminatorju. Tako smo obsevali 0, 1, 3, 5 in 10 minut.

Čeprav po 5 min in inkubiranju 30 min v EtBr pufri nismo videli vzorcev na UV svetlobi, smo se vseeno odločili, da bomo izvedli hibridizacijo točkovnega odtisa. Tudi hibridizacija ni dala pozitivnega rezultata.

Z elektroforezo smo želeli preveriti, če je v vzorcih dobljenih z lovljenjem virusnih delcev na protitelesa prisotna virusna RNA. Na gel smo nanesli po 9 µl vzorcev in pustili teči elektroforezo 30 min na 200 V. Poleg vzorcev smo nanesli velikostni standard (1 kb Ladder, MBI Fermentas).

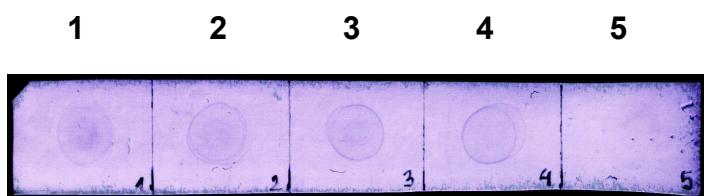
V vseh jamicah je opaziti šibek signal (Slika 8). Najšibkejši je pri vzorcu, kjer smo obdelali vzorec z virusi na 70 °C (4). Vzorec 5, glede na to, da je PVY- bi moral biti negativen, vendar je pri tem vzorcu prišlo do kontaminacije, kar smo potrdili z RT-PCR (Preglednica 6). Vsi vzorci so velikosti malo nad 10000 bp.



Slika 8: Preverjanje prisotnosti virusne RNA v vzorcih z gelsko elektroforezo: (1) 37 °C, PVY+, obdelan s proteinazo K, brez dodanega SDS; (2) 37 °C, PVY+, obdelan s pronazo E; (3) sobna temperatura, PVY+, obdelan s pronazo E; (4) 70 °C, PVY +; (5) 37 °C, PVY-, obdelan s proteazo E; (6) velikostni standard (1 kb Ladder, MBI Fermantas).

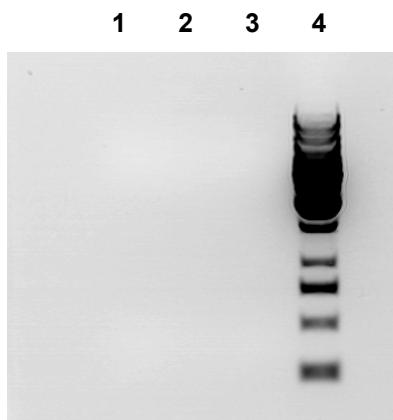
Ker smo z elektroforezo dokazali prisotnost virusne RNA v naših vzorcih, smo hibridizacijo točkovnega odtisa žeeli optimizirati še na druge načine. Najprej smo podaljšali čas hibridizacije, namesto dveh ur smo hibridizirali čez noč.

Po dveh urah inkubacije v substratni raztopini ni bilo na membrani opaziti specifičnega obarvanja. Po treh dneh inkubacije v substratni raztopini je na membrani opaziti šibko obarvanje (Slika 9). Cela membrana je obarvana. Vidni so obrisi nanosa vzorcev pri vseh vzorcih. Znotraj večjega vzorca je pri prvih treh opaziti šibko obarvanje, kar bi lahko bila virusna RNA, saj ga na četrtem vzorcu, ki je vzorec iz neokužene rastline, ni opaziti in prav tako ne pri petem vzorcu, kjer smo nanesli le vodo(Slika 9).



Slika 9: Hibridizacija točkovnega odtisa čez noč in 3 dnevni inkubaciji v substratni raztopini: (1) 37 °C, PVY+, obdelan s proteinazo K, brez dodanega SDS; (2) 37 °C, PVY+, obdelan s pronazo E; (3) sobna temperatura, PVY+, obdelan s pronazo E; (4) sobna temperatura, PVY-, obdelan s proteazo E; (5) DEPC voda.

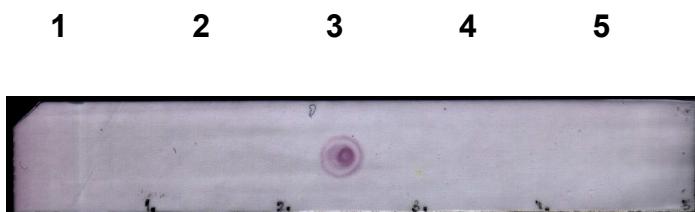
Ker je bil signal obarvanja tako šibek, smo ga hoteli ojačati s tem, da bi skoncentrirali virusno RNA v vzorcih. To smo naredili trikrat. Uspešnost koncentriranja smo preverili z elektroforezo, vendar nobeno koncentriranje ni dalo pozitivnega rezultata (Slika 10).



Slika 10 Uspešnost koncentriranja virusne RNA v vzorcih smo preverili z elektroforezo: (1) 37 °C, PVY+, obdelan s pronazo E, precipitiran; (2) 37 °C, PVY+, obdelan s pronazo E, neprecipitiran; (3) skoncentriran vzorec po RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup iz Rneasy Mini Handbook (06/2001); (4) velikostni standard (1 kb Ladder, MBI Fermentas).

Lovljenje virusnih delcev na protitelesa smo ponovili, vzorce smo skoncentrirali s precipitacijo. Uporabili smo drug postopek hibridizacije točkovnega odtisa po Kogovšek (2004), in ga deloma priredili našemu poskusu. Tokrat smo kot pozitivno kontrolo uporabili celokupno RNA izolirano iz okuženih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy (Qiagen). Uporabili smo mešanico sond, ki se ne vežejo med sabo (P2, P3, P1S).

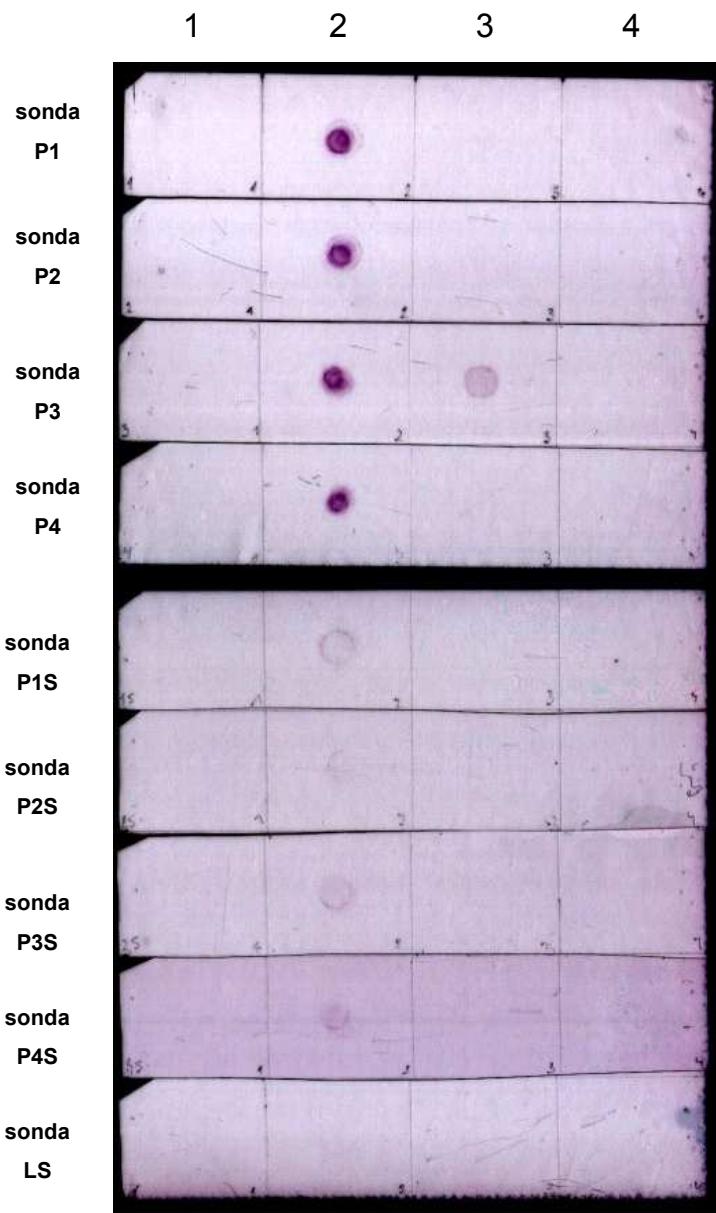
Po dveh urah inkubacije s substratom je bilaobarvana pozitivna kontrola (celokupna RNA izolirana iz okuženih rastlin krompirja z RNeasy) (Slika 11, vzorec 3). Pri skoncentriranem vzorecu ni bilo signala (Slika 11, vzorec 3), in tudi pri nobeni od negativnih kontrol (Slika 11, vzorci 1, 4 in 5).



Slika 11: Hibridizacija točkovnega odtisa IV: (1) DEPC voda; (2) skoncentriran vzorec s koncentriranjem III (glej Metode); (3) celokupna RNA izolirano iz okuženih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy; (4) celokupna RNA izolirano iz zdravih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy; (5) DEPC voda.

Ponovili smo postopek hibridizacije točkovnega odtisa IV, le da z vsako sondno posebej. S tem smo želeli ugotoviti, če se vse sonde enako dobro vežejo na virusno RNA (Slika 12).

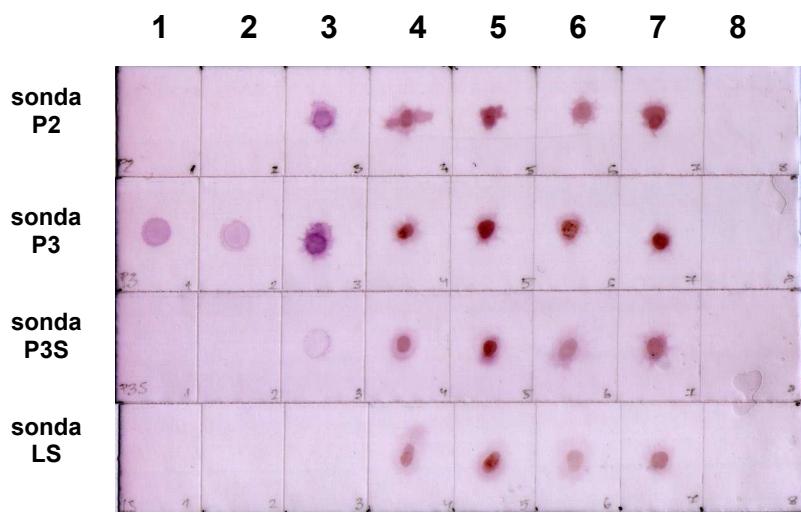
Signal je videti pri vseh protismiselnih sondah (Slika 12, P1-P4) za pozitivno verigo RNA virusa PVY pri celokupni RNA (Slika 12, vzorec 2) izolirani iz okuženih rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture s kitom RNeasy. Za negativno kontrolo hibridizacije smo uporabili nekomplementarno sondno LS, s katero nismo dobili nobenega obarvanja (Slika 12, LS). Tudi smiselne sonde za pozitivno verigo RNA so dale signal na membrani (Slika 12, P1S-P4S). Pri sondi P3 je opaziti signal tudi pri celokupni RNA izolirani iz neokuženih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy (Slika 12, vzorec 3). V skoncentriranem vzorcu iz koncentriranja III ni signala, prav tako tudi pri DEPC vodi (Slika 12, vzorca 1 in 4).



Slika 12: Hibridizacija točkovnega odtisa V z vsako sondou posebej: (1) skoncentriran vzorec s koncentriranjem III; (2) celokupna RNA izolirana iz okuženih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy; (3) celokupna RNA izolirana iz zdravih rastlin krompirja iz tkivne kulture s kitom RNeasy; (4) DEPC voda.

V naslednjem poskusu smo hoteli ugotoviti, če je v iztisnjenu rastlinskem soku dovolj virusa, da ga lahko zaznamo z metodo hibridizacije točkovnega odtisa. V ta namen smo strli okuženi in neokuženi rastlini krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture in rastlinski sok nanesli neposredno na membrano. Polovico rastlinskega soka smo pred nanosom na membrano obdelali s pronazo E (Slika 13).

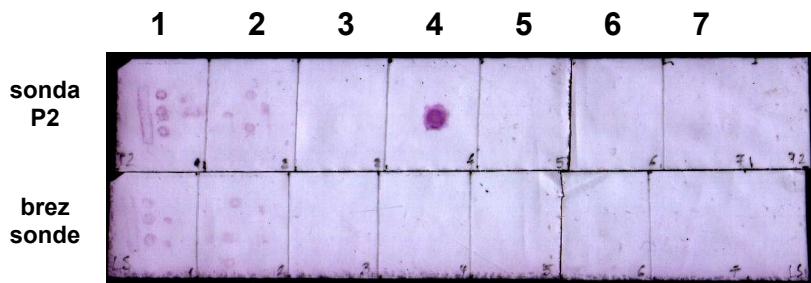
V poskusu smo uporabili tri različne sonde za virus PVY in sondi LS za negativno kontrolo. Pri sondi P3 je opaziti signal tudi pri celokupni RNA izolirani iz neokuženih rastlin krompirja iz tkivne kulture z RNeasy kitom (Slika 13, vzorec 1 in 2). Ostale sonde tu niso dale signala. Pri pozitivni kontroli so dale vse sonde za virus PVY signal (Slika 13, vzorec 3), le da je pri smiselnih sondi (P3S) signal šibkejši. Pri točkovnem odtisu svežega rastlinskega soka predstavljajo problem sledovi barvil iz rastlinskega soka na membrani, ki se jih težko loči od vijoličnega signala (Slika 13, vzorci 4-7).



Slika 13: Hibridizacija točkovnega odtisa VI: celokupna RNA izolirana iz zdravih rastlin krompirja sorte Pentland Squire (1) in sorte Sante (2) ter okuženih (3) rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture s kitom RNeasy; svež rastlinski sok iz zdravih (4) in okuženih (5) rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture; svež rastlinski sok iz zdravih (6) in okuženih (7) rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture obdelan s pronazo E; (8) DEPC voda.

V upanju, da ob odtisu tkiva na membrano ne bo sledov barvil iz rastlinskega soka opaziti na membrani, smo naredili še poskus odtisa tkiva na membrano. Pri tem smo uporabili okužene in neokužene rastline krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture. Ponovili smo postopek hibridizacije. Za poskus smo uporabili sondi P2 (Slika 14).

Pri celokupni RNA izolirani iz neokuženih rastlin krompirja iz tkivne kulture z Rneasy kitom ni signala (Slika 14, vzorec 3). Pri pozitivni kontroli smo opazili signal s sondi P2 za virus PVY (Slika 14, vzorec 4). Pri odtisu tkiva (prečni prerez stebla, vzdolžni prerez stebla in prečni prerez peclja) okužene in neokužene rastline krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture predstavljajo zopet problem sledovi barvil iz rastlinskega soka na membrani, ki so rjave barve in se jih težko loči od vijoličnega signala (Slika 14, vzorci 1 in 2). Pri odtisu tkiva obdelanem s pronazo E ni opaziti signala (Slika 14, vzorci 6 in 7).



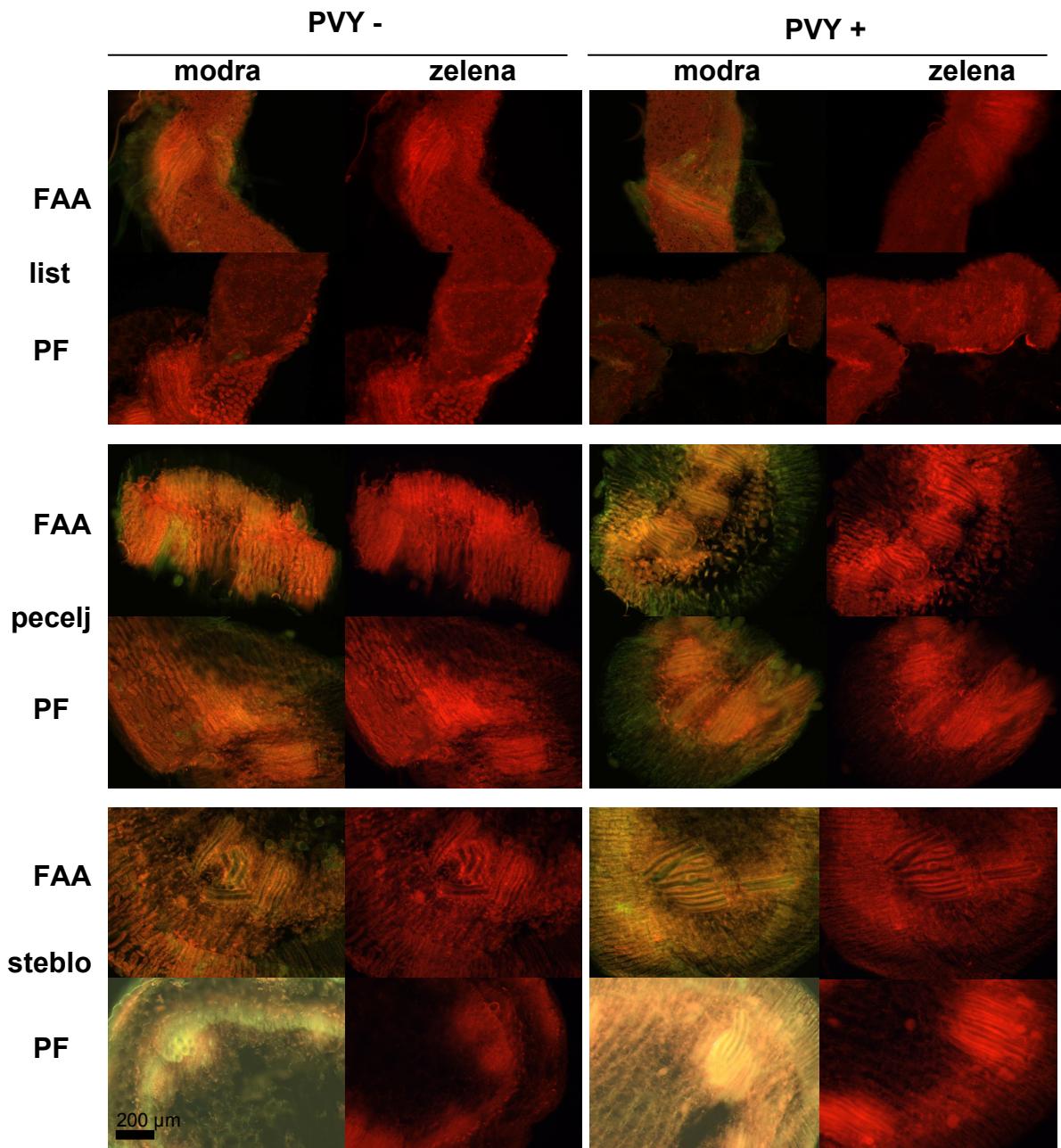
Slika 14: Hibridizacija točkovnega odtisa VII oz. odtis tkiva (prečni prerez stebla, vzdolžni prerez stebla in prečni prerez peclja) na membrano: odtis tkiva neokužene (1) in okužene (2) rastline; celokupna RNA izolirana iz neokuženih (3) in okuženih (4) rastlin s kitom RNeasy ; (5) DEPC voda; odtis tkiva neokužene (6) in okužene (7) obdelan s pronazo E. Ves rastlinski material je bil iz rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture.

4.4 Hibridizacija virusne RNA *in situ*

4.4.1 Hibridizacija *in situ* na svežih rezinah s fluorescentno označenimi sondami

Preizkusili smo postopek hibridizacije po Borlido in sod. (2002) na svežih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture fiksiranih v FAA in 4% PF. Za hibridizacijo smo uporabili fluorescentno označene sonde za PCR. Preparate smo opazovali z modro (450-490 nm) in zeleno (546 nm) ekscitacijsko svetlobo (Slika 15).

Na vseh preparatih je veliko avtofluorescence, saj se v celicah ohrani klorofil, druga rastlinska barvila in sekundarne spojine. Tako rezine s PVY okuženih kot tudi neokuženih rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture so bile pri osvetljevanju z modro svetlobo videti rdeče (avtofluorescenco klorofila). Morfološko je tkivo slabo ohranjeno. Tkivo je bolje ohranjeno pri fiksaciji rezin v 4% PF. Preparati s PVY neokuženih rastlin izgledajo bolj rdeči (Slika 15).



Slika 15: Hibridizacija *in situ* na svežih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire s fluorescentnimi sondami: Prvi in drugi stolpec prikazujeta preparate lista, peclja in steba neokuženih rastlin krompirja fiksirane v FAA ali 4% PF opazovane z modro (450-490 nm) in zeleno (546 nm) ekscitacijsko svetlogo, medtem ko tretji in četrti stolpec prikazujeta preparate okuženih rastlin krompirja.

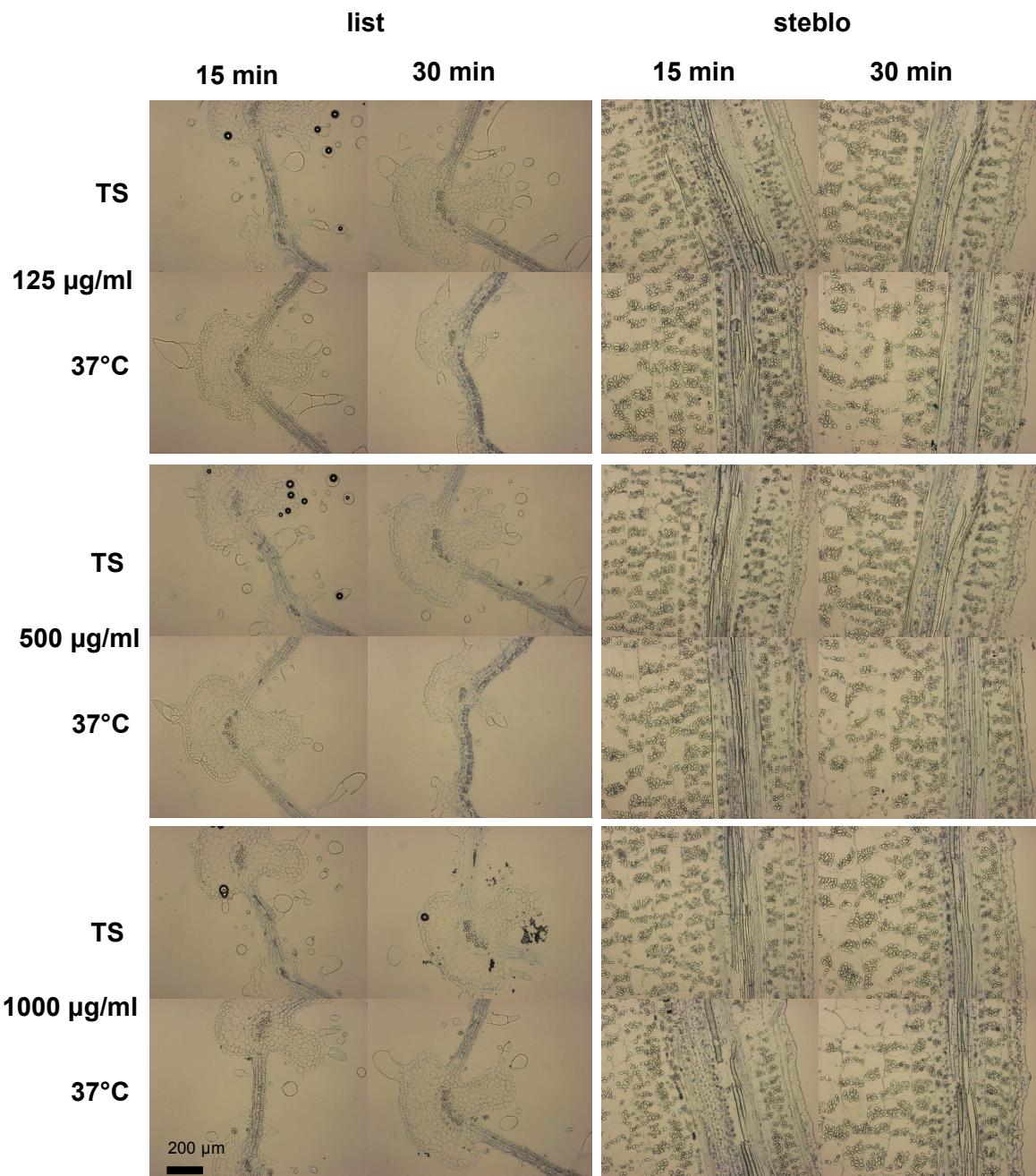
4.4.2 Hibridizacija *in situ* na parafinskih rezinah s fluorescentno označenimi sondami

Ker je bila avtofluorescanca svežih rezin prevelika, smo se odločili še za hibridizacijo *in situ* na rezinah vklopljenih v vosek in fiksiranih v FAA, saj se v teh ohrani mnogo manj klorofila. Zopet smo uporabili fluorescentno označeno sondi za PCR. Parafinske rezine je potrebno pred hibridizacijo delno razgraditi s proteinazo, da olajšamo dostop sonde do tarčnih mest.

4.4.2.1 Test razgradnje tkivnih rezin s pronazo E

Za določitev optimalnega delovanja pronaze E na tkivo smo izvedli test, pri katerem smo tkivo, fiksirano v FAA, izpostavili različnim koncentracijam pronaze E (125, 500, 1000 µg/ml), pri različnih temperaturah (sobna temperatura in 37 °C) in z različnim časom delovanja (15 in 30 minut) (Slika 16).

V listih je opaziti razlike predvsem pri trahejah. V steblu je vidnih manj razlik pri različnih koncentracijah pronaze E. Tkivo je najbolj razgrajeno pri koncentraciji pronaze E 1000 µg/ml, pri 37 °C in 30 minutnem delovanju pronaze E (Slika 16).

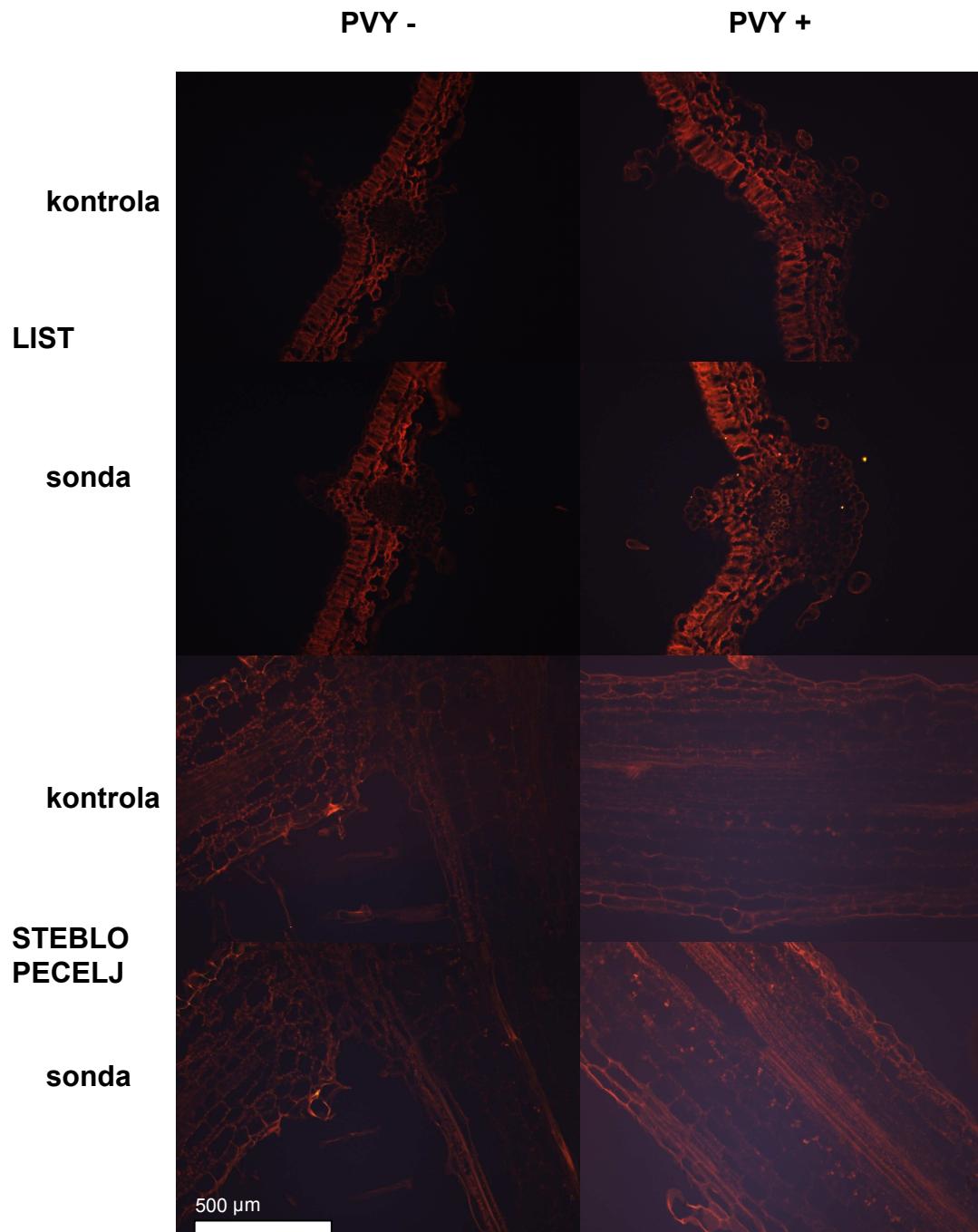


Slika 16: Test delovanja pronaze E pri različnih pogojih, tkivo fiksirano v FAA: Prvi in drugi stolpec prikazujeta preparate lista obdelane 15 ali 30 min za različnimi koncentracijami (125, 500, 1000 µg/ml) pronaze E pri različnih temperaturah (TS - sobna temperatura, 37 °C). Tretji in četrti stolpec prikazujeta preparate vzdolžnega prerezja steba obdelane na enak način.

4.4.2.2 Hibridizacija

Na vseh preparatih je videti veliko avtofluorescence, tako da morebitne fluorescence sonde ni opaziti. Pri preparatu steba okužene rastline je fluorescencija ponekod močnejša, vendar

je to opaziti pri sondi in tudi pri kontroli brez sonde. V listu okužene rastline ob uporabi sonde močno svetijo ksilemske žile, pri kontroli pa ne (Slika 17).

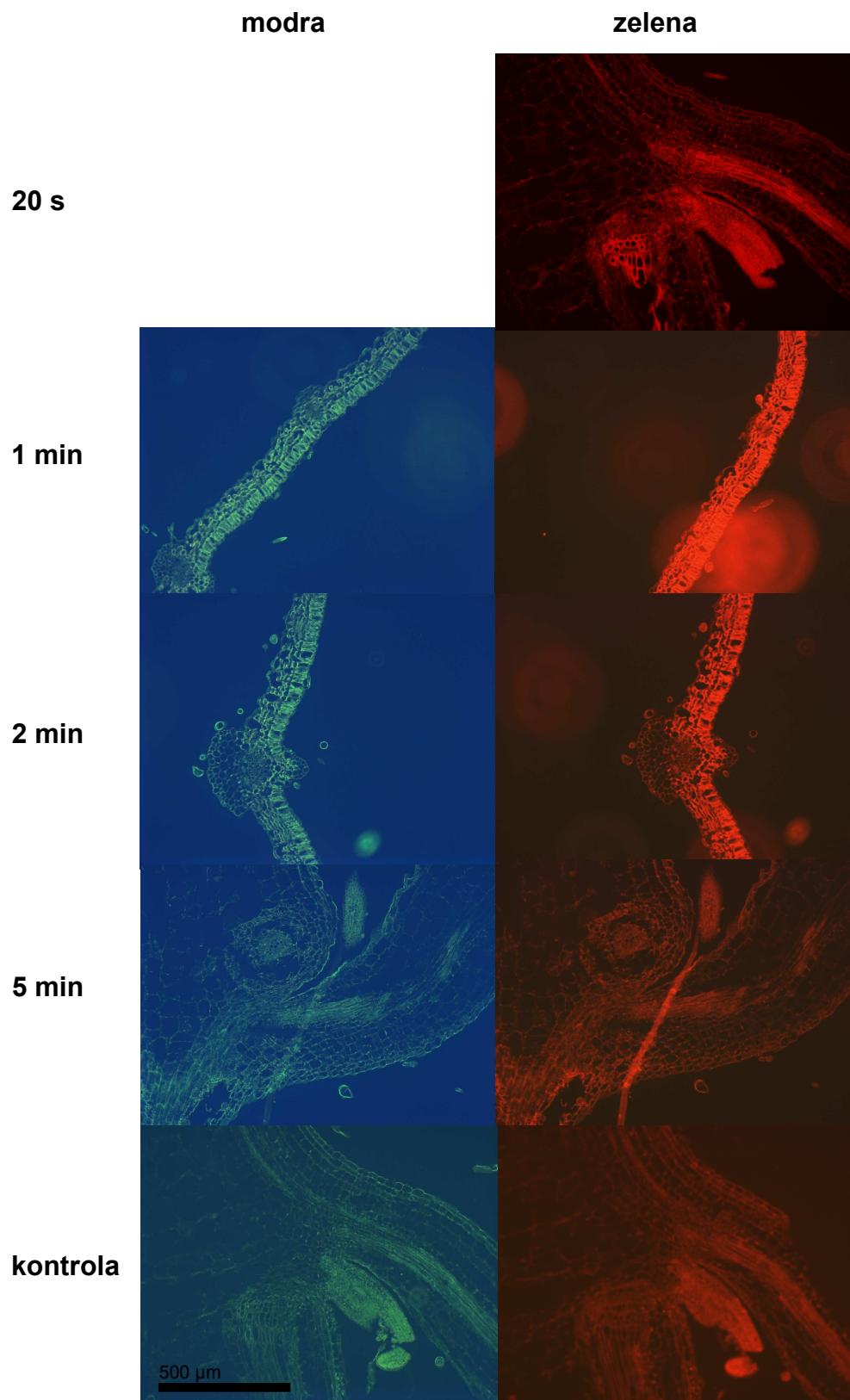


Slika 17: Hibridizacija *in situ* na tkivnih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire fiksiranih v FAA in vklopljenih v vosek, s fluorescentnimi sondami: Prvi stolpec prikazuje preparate lista in stebla s pecljem neokuženih rastlin krompirja fiksirane v FAA opazovane z modro (450-490 nm) ekscitacijsko svetljobo hibridizirane s sondom ali brez, medtem ko drugi stolpec prikazuje preparate okuženih rastlin krompirja.

4.4.2.3 Poskus utišanja avtofluorescence

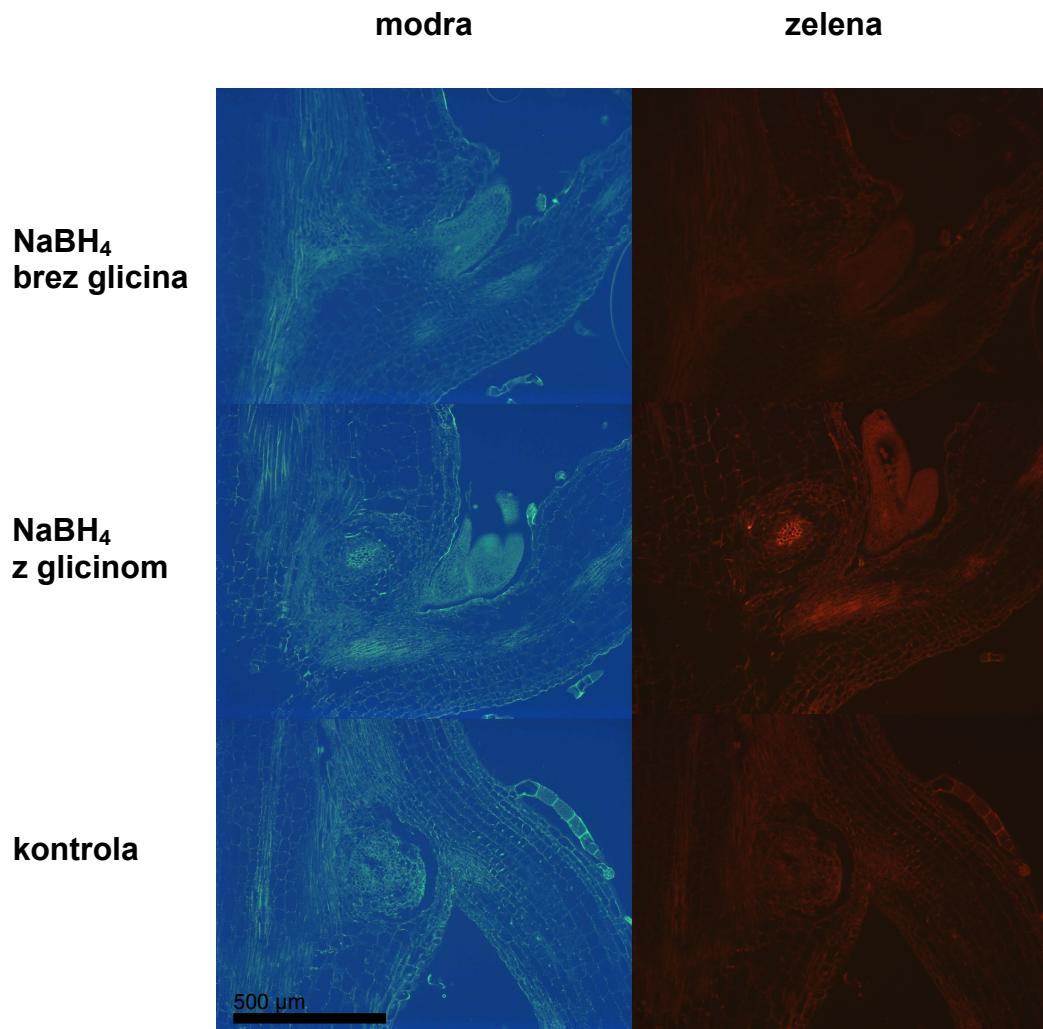
Ker je avtofluorescencija predstavljala oviro pri opazovanju preparatov, smo jo poskušali utišati z 0,1% kristal vijoličnim (Slika 18) ter z glicinom in natrijevim borohidridom (Slika 19). Kristal vijolično smo pustili delovati 20 sekund, 1, 2 in 5 minut.

Pri poskusu utišanja avtofluorescence s kristal vijoličnim ter z glicinom in NaBH₄ ni bilo opaziti nobenih razlik v avtofluorescenci med kontrolo in obdelanima preparatoma (Slika 18, Slika 19).



Slika 18: Poskus utišanja autofluorescence na tkivnih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire fiksiranih v FAA in vklopljenih v vasek, s fluorescentnimi sondami: Prvi stolpec prikazuje preparate

stebla s pecljem neokuženih rastlin krompirja fiksirane v FAA obdelane s 0,1% kristal vijoličnim, opazovane z modro (450-490 nm) ekscitacijsko svetlobo. Drugi stolpec prikazuje iste preparate opazovane z zeleno (546 nm) ekscitacijsko svetlobo.

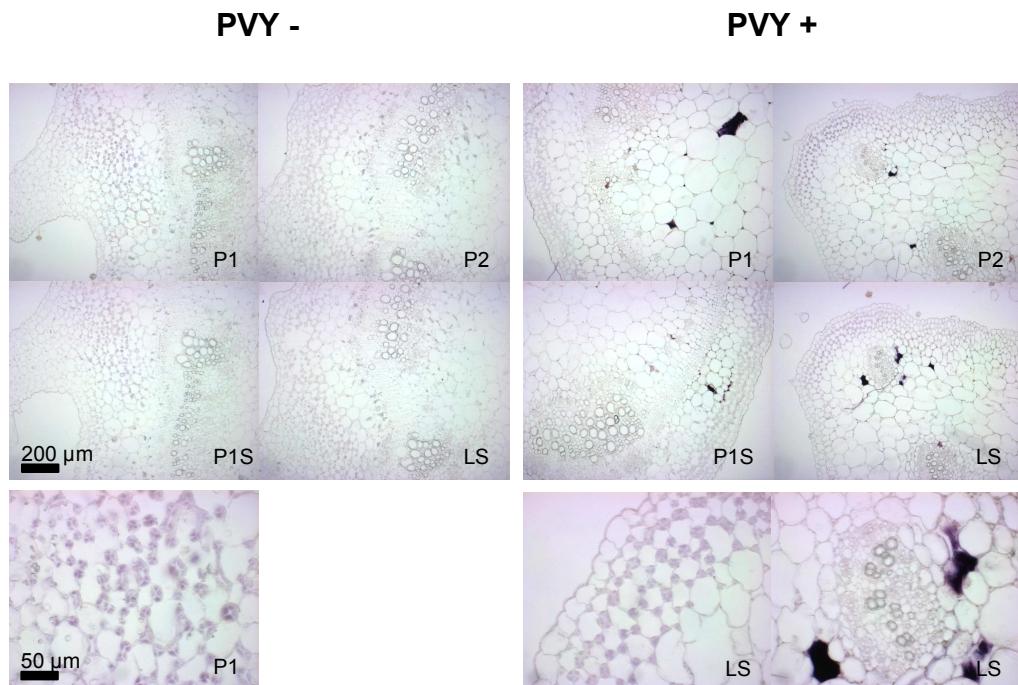


Slika 19: Poskus utišanja autofluorescence na tkivnih rezinah rastlin krompirja sorte Pentland Squire fiksiranih v FAA in vklopljenih v vosek, z natrijevim borohidridom (NaBH₄) in glicinom: Prvi stolpec prikazuje preparate stebla s pecljem neokuženih rastlin krompirja fiksirane v FAA obdelane z ali brez natrijevega borohidrida in dodanim glicinom, opazovane z modro (450-490 nm) ekscitacijsko svetlobo. Drugi stolpec prikazuje iste preparate opazovane pod zeleno (546 nm) ekscitacijsko svetlobo.

4.4.3 Hibridizacija *in situ* na parafinskih rezinah s sondami označenimi z digoksigeninom

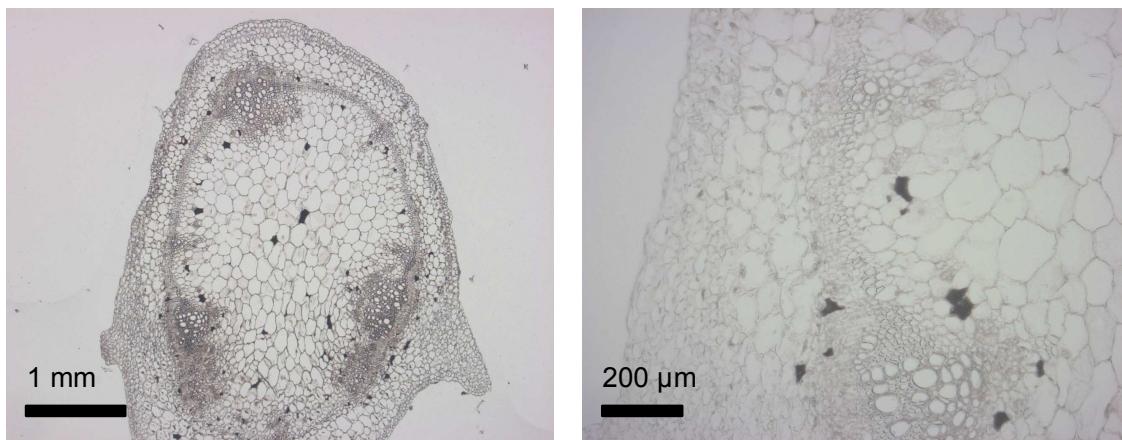
Ker je s fluorescentnimi sondami težko delati zaradi avtofluorescence tkiva, smo uporabili označevanje, ki je vidno s presevno svetlobo. Sonde označene z digoksigeninom smo preizkusili na tkivnih rezinah. Uporabili smo sonde P1, P2, P1S in kot negativno kontrolo še sondu LS.

Pri preparatih s PVY neokuženega tkiva ni bilo opaziti obarvanja, razen obarvanja kolenhima. Veliko je bilo videti škrobnih zrn. Pri preparatih s PVY okuženega tkiva specifičnega signala hibridizacije nismo opazili, pri vseh sondah (tudi pri nesmiselni sondi LS) pa smo prav tako opazili obarvanje kolenhima (Slika 20). V posameznih celicah okuženih rastlin smo opazili tudi temno obarvanje (Slika 20), ki ni posledica hibridizacije, saj je vidno tudi na nehibridiziranih preparatih (Slika 21).

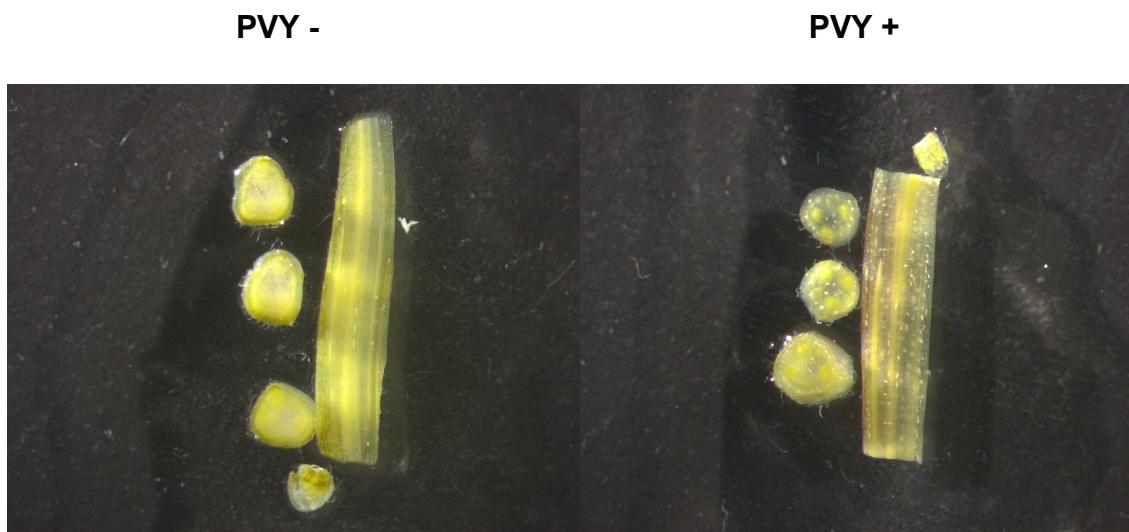


Slika 20: Hibridizacija *in situ* na rezinah rastlin krompirja sorte Igor iz rastlinjaka s sondami označenimi z digoksigeninom: Prvi in drugi stolpec prikazujeta preparate listnega peclja neokuženih rastlin krompirja fiksiranih v FAA z uporabo različnih sond navedenih v spodnjem desnem kotu vsake slike, medtem ko tretji in četrti stolpec prikazujeta preparate okuženih rastlin.

Preverili smo, če so morda celice že same po sebi pobarvane. Po rehidraciji smo opazovali preparam peclja in smo videli velike temno obarvane celice (Slika 21). Te celice so vidne že pod lupo pri okuženih rastlinah krompirja (Slika 22).



Slika 21: Temne celice na rezini okužene rastline krompirja sorte Igor iz tkivne kulture fiksirane v FAA, vklopljene v vosek in inkubirane z NBT/BCIP, brez hibridizacije *in situ*.



Slika 22: Slika svežih prečnih in vzdolžnih rezin tkiva steba in peclja rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture. Na levi sliki so prerezi neokužene, na desni pa okužene rastline.

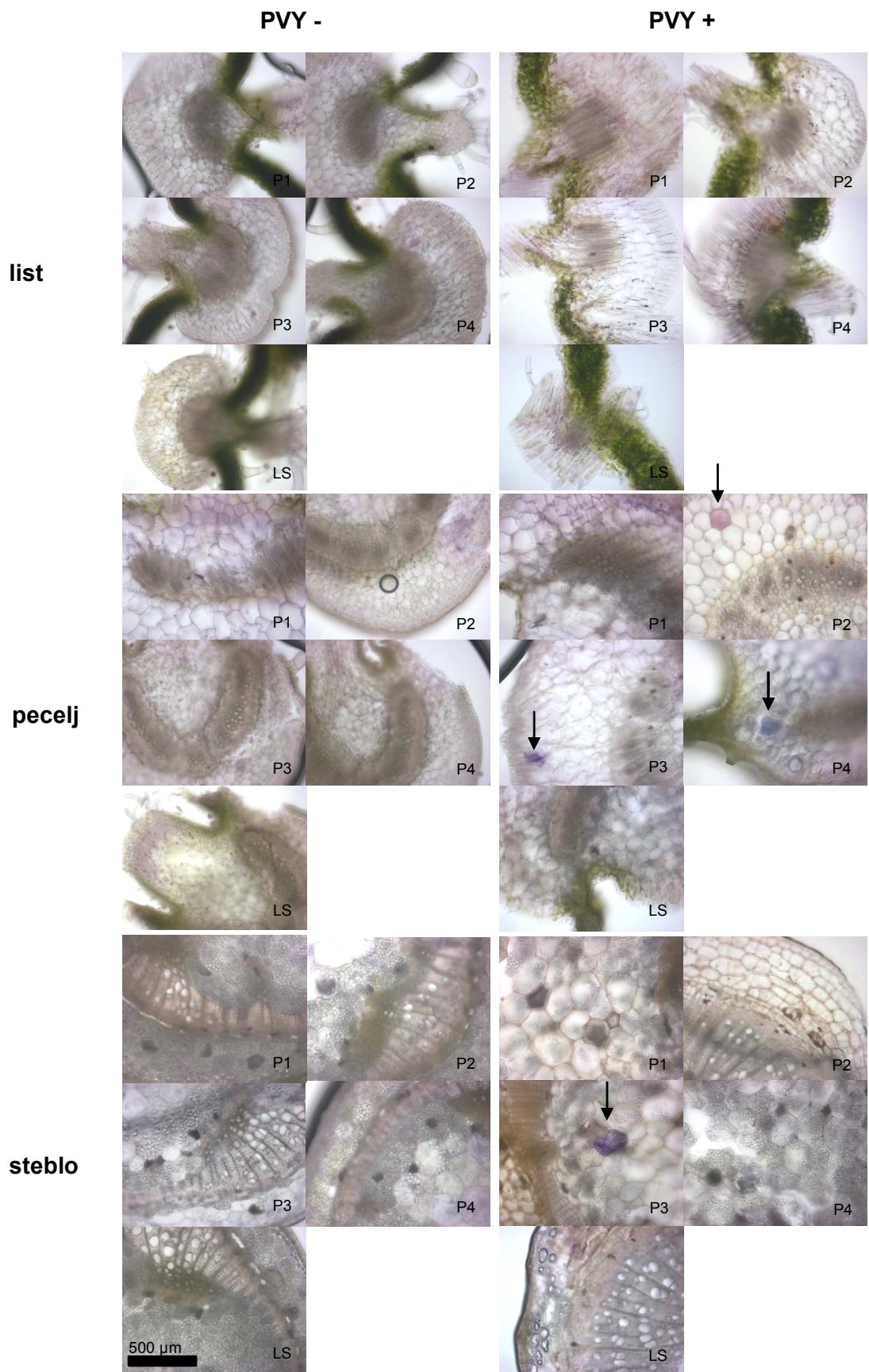
4.4.4 Hibridizacija *in situ* z uporabo tiramidnega sistema za ojačanje signala

Na rezinah ki smo jih obdelali s tiramidnim sistemom za ojačanje signala, je bilo opaziti obarvanje kolenhima po celiem preparatu na obodu rezine peclja, tudi na rezinah rastlin krompirja, ki niso bile okužene z virusom PVY, ter na rezinah okuženih rastlin, kjer smo uporabili nesmiselno sondu. Specifičnega obarvanja ni opaziti na nobeni rezini (rezultati niso prikazani).

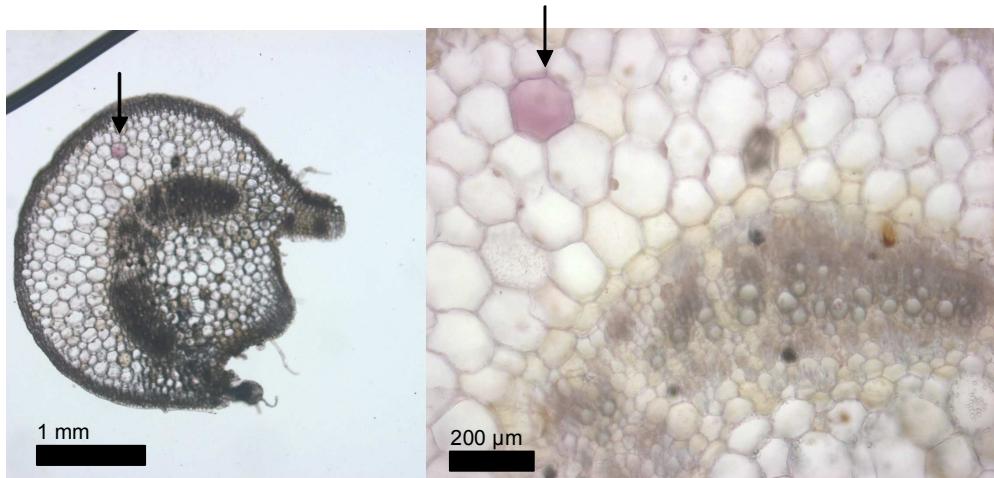
4.4.5 Hibridizacija *in situ* na svežih rezinah s sondami označenimi z digoksigeninom

Po Borlido in sod. (2002) smo izvedli hibridizacijo na svežih rezinah tkiva tudi s sondami označenimi z digoksigeninom. Sveže rezine smo fiksirali v fiksativu Histochoice. Poskus smo izvedli na svežih okuženih in neokuženih rastlinah vzgojenih v rastlinjaku. Uporabili smo vse štiri protismiselne sonde za negativno verigo RNA (P1-P4) in nesmiselno sondu LS kot kontrolo.

Pri rezinah neokuženih rastlin nismo opazili specifične obarvanosti, videti je le večje število temnih celic, vendar manj kot v okuženih. Pri rezinah okužene rastline je pri sondah P2, P3 in P4 na po eni rezini opaziti posamično vijolično obarvano celico. Tri vijolične celice so bile na preparatu peclja, ena pa je bila na steblu (Slika 23, Slika 24). Pri nesmiselni sondi LS na rezinah okužene rastline ni opaziti takih celic.



Slika 23: Hibridizacija *in situ* na svežih rezinah rastlin krompirja sorte Igor iz rastlinjaka fiksiranih v fiksativu Histochoice. Prvi in drugi stolpec prikazujeta preparate lista, peclja in stebla neokuženih rastlin z uporabo različnih sond navedenih v spodnjem desnem kotu vsake slike, medtem ko tretji in četrti stolpec prikazujeta preparate okuženih rastlin krompirja. Uporabili smo štiri protismiselne oligonukleotidne sonde (P1-P4) in nesmiselno sondu (LS), označene z digoksigeninom in detekcijo z NBT/BCIP. Puščice označujejo specifično obarvanje celic.



Slika 24: Hibridizacija *in situ* na svežih rezinah rastlin krompirja sorte Igor iz rastlinjaka fiksiranih v fiksativu Histochoice. Slika prikazujeta preparat peclja okuže rastline krompirja. Puščice označujejo specifično obarvanje celic.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

Hibridizacija nukleinskih kislin se je izkazala za občutljivo in zanesljivo metodo za lokalizacijo rastlinskih virusov (Hsu in sod., 2000). Z metodo hibridizacije *in situ* so Mielke in sod. (2006) uspešno lokalizirali tip bunjavirusne RNA, Mortimer-Jones in sod. (2007) in Rajamäki in Valkonen (2002) različne krompirjeve viruse.

V poskusih smo uporabljali okužene rastline iz tkivne kulture in rastline, ki smo jih gojili v rastni komori, in jih šele nato okužili z rastlinskim sokom okuženih rastlin. Pri rastlinah, ki smo jih okuževali sami, smo opazovali razvoj bolezenskih znamenj in znakov ranitve in staranja. Pri eni izmed rastlin so se lepo izrazili boleznska znamenja kot mozaični vzorec na listih. Lokalni boleznska znamenja se po Mehle in sod. (2004) na okuženih listih visoko občutljive sorte krompirja Igor pojavijo 4 do 5 dni po inokulaciji. Inokulirani listi porumenijo in odpadejo v 10 dnevih po okužbi. Tudi pri naših rastlinah krompirja so okuženi listi odpadli do 12 dneva po inokulaciji. Sistemska boleznska znamenja se po Mehle in sod. (2004) pojavijo med 9 in 11 dnevom po inokulaciji. Zato smo rastline uporabili za poskuse 12 dni po okužbi, saj smo predvidevali, da se je virus do takrat razširil po celi rastlini. To potrjujejo tudi rezultati Mehle in sod. (2004), kjer so z ELISA testom ugotavljali prisotnost PVY^{NTN}. Tudi Garcia-Castillo in sod. (2001) so v poskusih detekcije virusa CarMV s hibridizacijo točkovnega odtisa ugotovili prisotnost virusa v neinokuliranih delih rastline šele 14 dni po okužbi pri rastlinah gojenih v rastlinjakih, nikoli pa pri rastlinah v rastnih komorah. Rajamäki in Valkonen (2003) so opazovali sistemsko okužbo rastlin krompirja po mehanski inokulaciji z virusom PVA. Z ELISA testom niso zaznali sistemske okužbe v listih 14 dni po inokulaciji, 17 dni po inokulaciji pa so jo v zgornjih treh listih. Zhou in sod. (2004) so prve sistemska boleznska znamenja opazili 8-13 dni po okužbi.

Za naše poskuse smo uporabili različne dele rastlin, zato smo jih pred fiksiranjem ločili glede na mesto okužbe (pod, nad in okuženo mesto) in posebej na rastlinske organe (steblo, listni pecelj, list). Večino poskusov smo izvajali na neinokuliranih delih rastline nad mestom okužbe. V zgornjih listih in vršičkih so Mehle in sod. (2004) pri sorti Igor z ELISA testom zaznali virus med 8 in 9 dnevom po okužbi. Tako bi moral biti prisoten virus tudi v delih rastlin, ki smo jih mi uporabljali za poskuse.

Za hibridizacijo *in situ* smo se odločili, da bomo uporabili oligonukleotidne sonde, saj je Nikolić (2006) v diplomskem delu ugotovila, da so za lokalizacijo mRNA *in situ* na rastlinskem tkivu najprimernejše. Ugotovili so, da je najbolj primerna dolžina nad 30

nukleotidov. Tudi Webb in sod. (1999) so ugotovili, da je metoda hibridizacije *in situ* z oligonukleotidnimi sondami primerljiva in enako specifična kot druge metode, saj so prišli do podobnih rezultatov kot z elektronsko mikroskopijo in imunokemično lokalizacijo. Z metodo s haptrenom označenih oligonukleotidov in AP-NBT/BCIP detekcijo so s 24 nukleotidov dolgimi sondami zaznali mRNA v hipofizi podgan. Vendar ko so spremenili le en nukleotid v sondi, tarče niso več zaznali, kar kaže na visoko specifičnost metode.

Sprva smo želeli lokalizirati virus PVY v tkivnih rezinah rastlin krompirja iz tkivne kulture s fluorescentnimi oligonukleotidnimi sondami, ki se jih uporablja kot začetnike za PCR v realnem času. Uporaba zaporedij začetnikov za PCR kot oligonukleotidnih sond ima pomembno prednost pred ostalimi sondami, ker so začetniki za večino znanih povzročiteljev bolezni dostopni (Webb in sod., 1999). Pri poskusu smo naleteli na težavo, ker je rastlinsko tkivo močno avtofluoresciralo. Po »Autofluorescence: Causes and Cures« (2006) je najpogosteji razlog za to naravna fluorescensa tkiva, ali pa fluorescensa kot posledica fiksativov. Spekter obeh tipov fluorescence je zelo širok v primerjavi s spektrom fluorokromov, s katerimi označujemo sonde, zato se signal težko loči od signala avtofluorescence. Naravna fluorescensa je v večini posledica prisotnosti flavinov, porfirinov in klorofila (Autofluorescence: Causes and Cures, 2006). Poleg tega so bili v okuženih rastlinah prisotni antociani, zaradi katerih so stebla rastlin rdeča. Antocianini so posledica stresa rastlin (Anžlovar in sod., 1996). Klorofil je bil verjetno tudi razlog za avtofluoresenco svežih rezin tkiva, saj se ga je večina ohranila v celicah. V ta namen smo naredili še hibridizacijo *in situ* na tkivnih rezinah vklopjenih v vosek. Tudi v tem primeru je bilo še vedno preveč avtofluorescence, da bi lahko izločili signal sonde. Fluorescensa, ki je posledica fiksativov, nastane ko aldehidni fiksativi reagirajo z amini in proteini in tvorijo fluorescentne produkte. Blokiranje aldehidov je mogoče z reduciranjem skupin z natrijevim borohidridom (Autofluorescence: Causes and Cures, 2006). Ob uporabi paraformaldehyda za fiksiranje naj bi bila avtofluorescensa šibka, medtem ko je pri glutaraldehydu močnejša (Autofluorescence: Causes and Cures, 2006). V literaturi smo poiskali metode za zmanjšanje oziroma utišanje avtofluorescence. Za povišanje razmerja med signalom sonde in signalom ozadja v laboratorijih NIB uporabljajo med drugim tudi 0,1% kristal vijolično. S tem smo tudi sami poskušali utišati avtofluoresenco. Fluorescenco smo uspeli delno utišati že po 20 sekundah delovanja kristal vijoličnega, vendar je z zelenim ekscitacijskim filtrom vidne še vedno veliko avtofluorescence, ker tudi kristal vijolično absorbira zeleno svetlobo in oddaja rdečo. FAM, vezan na sondi, absorbira modro svetlobo in oddaja zeleno, ta pa ekscitira TAMRO, ki sveti nato z rdečo svetlobo. Če uporabimo kristal vijolično, ta absorbira zeleno svetlobo in fluorescira v istem območju kot TAMRA, zato njenega signala ne vidimo. Avtofluoresenco se lahko utiša tudi z natrijevim borohidridom in včasih še z dodanim glicinom (Autofluorescence: Causes and Cures, 2006, in protokolih, ki jih uporabljajo v laboratorijih NIBa). Rezultati niso pokazali razlik v avtofluorescenci med kontrolo in obdelanimi preparati, tako da tudi nobena izmed teh metod ni primerna za utišanje avtofluorescence na naših preparatih, saj

se v večini uporabljata za zmanjšanje fluorescence na živalskih tkivih, ki je posledica fiksacije. Webb in sod. (1999) so ugotovili, da je najbolj primerna fluorescentna sonda za uporabo v rastlinah Cy5. Poleg tega je po Pompe-Novak in sod., 2001 v okuženem rastlinskem tkivu več kloroplastov, zaradi česar bi bila avtofluorescencija višja, in bi zakrila signal sonde.

Ker nam ni uspelo utišati avtofluorescence smo se odločili, da bomo skonstruirali sonde označene z digoksigeninom. Skonstruirali smo 4 protismiselne sonde za pozitivno verigo virusne RNA in njihove smiselne različice, za različne dele zaporedja virusne RNA, ki kodira plaščne proteine. V ta namen smo vzeli 4 mesta, kjer je variabilnost v nukleotidnem zaporedju med različki virusa PVY najmanjša. Izbrane sonde P2, P3 in P4 se popolnoma ujemajo z izolatom virusa PVY^{NTN} v preučevanih rastlinah (oznaka v bazi NCBI AF321554), sonda P1 pa se razlikuje v enem nukleotidu. Sonde smo načrtovali v programu PrimerExpress™ 2.0 (Applied Biosystems, ZDA). S programom MFOLD smo preverili, katere od predlaganih sond tvorijo najmanj sekundarnih struktur in dimerov. Odločili smo se za štiri sonde, ki so najbolj ustrezale zahtevanim pogojem. Od vseh sond sonda P2 tvori največ sekundarnih struktur in je tako morda najmanj primerna. Poleg tega smo za vse sonde uporabili tudi smiselne (komplementarne) različice, saj je virusna RNA med replikacijo tudi v negativni obliki, ob kateri se tvorijo nove pozitivne virusne RNA (Bustamante, 1998). Nass in sod. (1998) so pri virusu BYDV (pozitivna veriga RNA) ugotovili, da lahko tako pozitivno, kot tudi negativno verigo RNA zaznajo tekom cikla okužbe. Negativne verige so več zaznali v zgodnjih fazah okužbe, najprej v jedru in nekoliko kasneje v citoplazmi. Obe verigi RNA sta prisotni zgodaj v okužbi, vendar je proti koncu okužbe večinoma prisotna pozitivna veriga RNA, medtem ko je negativno verigo težje zaznati. S programom Geneious smo preverili, kako se sonde vežejo med seboj, v primeru, da bi uporabili mešanice sond. S pomočjo orodja BLAST smo v podatkovnih bazah vseh znanih genskih bank preverili, če imajo izbrane sonde nepričakovane homologije z rastlinskimi geni. Sonde smo naročili preko spletja pri MWG-Biotech AG.

Če se sonde vežejo na virusno RNA smo preverili s testom sond s hibridizacijo točkovnega odtisa. Na membrano smo nanašali RNA, izolirano z metodo lovljenja virusnih delcev na protitelesa. Sprva smo nanesli le 2 µl vzorca, v katerem smo zaznali več virusne RNA z metodo RT-PCR v realnem času, t.j. vzorec, ki smo ga obdelali s pronazo E na 37 °C. Ker nismo dobili pozitivnih rezultatov, smo optimizirali čas vezave RNA na membrano z UV svetlobo. Z elektroforezo smo preverili prisotnost RNA v vzorcih. Na gelu smo nanesli vzorce, ki smo jih različno obdelali po lovljenju virusnih delcev na protitelesa. Na gelu smo zaznali šibek signal pri vzorcih, za katere smo že z RT-PCR v realnem času dokazali prisotnost virusne RNA. Glede na to, da smo z elektroforezo potrdili prisotnost virusne RNA, smo sklepali, da smo na točkovni odtis nanesli le premajhno količino vzorca, zato

smo v naslednjih poskusih nanesli bistveno večjo količino vzorca in podaljšali čas hibridizacije, vendar tudi ta poskus ni dal pozitivnih rezultatov.

S precipitacijo in po protoklu RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup iz Rneasy Mini Handbook (06/2001) smo želeli še bolj skoncentrirati virusno RNA v naših vzorcih. Po vsakem koncentriranju smo uspešnost le tega preverili z elektroforezo. Nobena elektroforeza ni pokazala prisotnosti virusne RNA. Tako smo sklepali na razgradnjo virusne RNA v vzorcih, kljub temu da smo vse postopke izvajali s previdnostjo pred okužbami z RNazami. Postopek lovljenja virusnih delcev na protitelesa smo ponovili in zopet skoncentrirali virusno RNA s precipitacijo in preverili prisotnost virusne RNA v vzorcih za elektroforezo. Tudi tokrat nismo dobili pozitivnih rezultatov, sklepali smo, da je morda virusne RNA tako malo, da je ni mogoče zaznati z elektroforezo.

Kasneje smo se odločili za postopek hibridizacije točkovnega odtisa, ki je v preteklosti v naših laboratorijih že dal pozitivne rezultate in ga je Kogovšek (2004) uporabila v diplomskem delu za dokaz gena za linusitin. Odločili pa smo se tudi za pozitivno kontrolo poskusa, t.j. za celokupno RNA izolirano z RNeasy iz okuženih rastlin krompirja sorte Pentland Squire iz tkivne kulture. Za hibridizacijo smo uporabili tri različne sonde, ki se v mešanici najmanj verjetno vežejo med seboj. Tokrat smo po dveh urah inkubacije v substratu dobili obarvano liso na membrani, in sicer na mestu, kjer smo nanesli pozitivno kontrolo. S tem smo dokazali, da se vsaj ena izmed uporabljenih sond veže na virusno RNA in, da je postopek hibridizacije točkovnega odtisa ustrezен. V našem vzorcu pa je očitno premalo virusne RNA, da bi jo lahko zaznali. Postopek smo ponovili z vsako sondą posebej in zopet dobili rezultate le pri pozitivni kontroli. Signal smo dobili pri vseh sondah za virus PVY, pri nesmiselni sondi pa ne. Močnejši signal je bil pri protismiselnih sondah za pozitivno verigo, medtem ko je bil signal pri smiselnih sondah za pozitivno verigo šibek (smiselne sonde se vežejo na negativno verigo virusne RNA). Kogovšek (2007) je s PCR v realnem času dokazala, da je v rastlini približno 10x manj negativne verige kot pozitivne verige virusne RNA. Pri sondi P3 je opaziti signal, vendar šibkejši tudi pri negativni kontroli (celokupni RNA neokužene rastline krompirja). Razlog za to je verjetno nespecifična vezava sonde na rastlinske tarče, saj ima ta višjo temperaturo taljenja kot ostale sonde. V nadaljevanju smo poskusili, če je v kapljici svežega soka morda dovolj virusa, da bi ga zaznali s hibridizacijo, saj naj bi bila ta količina virusa primerljiva s količino virusa v tkivnih rezinah. Tako smo svež rastlinski sok nanesli na membrano in hibridizirali. Pri interpretaciji rezultatov pa so se kot problem pojavila rastlinska barvila iz soka, ki so obarvala membrano na mestu nanosa, tako da je bilo nemogoče ločiti barvo barvil od barve sonde. Izvedli smo še postopek odtisa tkiva na membrano, saj smo sklepali, da bo v tem primeru manj barvil, ki bi motila signal sonde, vendar je bilo spet opaziti sledove barvil rastline, tako da ni bilo mogoče ločiti signala sonde od rastlinskih barvil. Leta 2004 so Mehle in sod. že izvajali odtis tkiva na membrano, vendar so ga locirali s protitelesi proti PVY kot so jih uporabljali za ELISA test. Prisotnost virusa so opazili kot

temne pike v predelu žil, vendar pa bolj natančna lokalizacija ni bila mogoča. Od 60 vzorcev pri katerih so z ELISA potrdili virus, so ga z metodo odtisa na membrani zaznali le pri 37 vzorcih. Singh M. in Singh R.P. (1995) sta preizkušala občutljivost detekcije PVY^O s hibridizacijo točkovnega odtisa očiščene RNA, ekstraktov lista in gomoljev. Izkazalo se je, da lahko zaznajo s to metodo 100 pg očiščene RNA in ekstrakte lista redčene do 1:256, ekstrakte gomolja pa redčene do 1:16. Pokazali so tudi, da je zelo pomemben način ekstrakcije nukleinskih kislin. Tudi Vozelj (2001) je v diplomskem delu z metodo odtisa tkiva potrdila prisotnost le v 37 vzorcih od 72 pozitivnih z metodo ELISA.

Z metodo RT-PCR v realnem času smo preverili kateri izmed postopkov najbolje odpre virusni proteinski plašč, torej pri katerem dobimo največ virusne RNA. Kombinacijo lovljenja virusnih delcev na protitelesa z RT-PCR so uporabili za koncentriranje »plum pox« virusa Wetzel in sod. (1992) in Hema in sod. (2003) virusa črtastega mozaika sladkornega trsa (Webster in sod., 2004). Na protitelesa polovljene viruse smo obdelali s pronazo E, proteinazo K z ali brez dodanega SDS, na različnih temperaturah, ter z denaturacijo na 70 °C. Po precipitaciji smo vzorce testirali z RT-PCR v realnem času. Rezultati so pokazali, da obdelava virusa s pronazo E na sobni temperaturi sprosti največ virusne RNA, sledil je tretma s pronazo E na 37 °C. Izkazalo se, je da je bil eden od kontrolnih vzorcev kontaminiran, saj je bila tudi v njem prisotna virusna RNA. V nadaljnjih poskusih smo zato za obdelavo rezin za boljšo odprtje plaščnega proteina uporabili pronazo E na sobni temperaturi 30 minut. Glede na to, da smo z metodo RT-PCR, vedno lahko zaznali virus, sklepamo, da je zelo občutljiva. To sta potrdila tudi Singh M in Singh R.P. (1996), ki sta zaznala 1 pg virusne RNA v vzorcih očiščene RNA.

Webb in sod. (1999) so v raziskavah ugotovili, da je predhibridizacijska proteolitična razgradnja bistvena za uspeh hibridizacije. Ugotovili so, da je bistven čas proteolitične razgradnje, saj je že 5-minutna razlika v času dala bistveno slabši signal. Pred izvajanjem postopkov hibridizacije smo se zato žeeli prepričati katera koncentracija in čas delovanja pronaze E sta najbolj primerna za ravno pravšnjo razgradnjo tkiva, da omogoča prehod sond do tarče, hkrati pa se še vedno dobro ohrani morfologija rezin. Tako smo rezine tkiva obdelali z različnimi koncentracijami pronaze E, ki smo jo pustili delovati 15 ali 30 min pri sobni temperaturi ali pa 37 °C. Ker ni mogoče preveriti učinkovitosti penetracije sonde, smo se odločili, da bomo uporabili tretma, pri katerem se še dobro ohrani morfologija rezin in so le-te še dobro pritrjene na objektna stekla. Izkazalo se je, da bo za nadaljnje poskuse najbolj primerna 30-minutna pronazna reakcija z najnižjo koncentracijo pronaze E (125 µg/ml) pri sobni temperaturi. Pri višji temperaturi se rezine lahko odlepijo od objektnega stekelca.

Sledili so poskusi hibridizacije *in situ*. Postopek hibridizacije *in situ* na tkivnih rezinah, vklopłjenih v vasek, smo izvedli po postopku, ki ga je optimizirala Nikolić (2006), le da smo pronazno reakcijo pustili teči 30 minut, saj smo v testu pronaze E ugotovili, da se pri

tem še vedno ohrani dobra morfologija tkiva. Pri rezinah okuženih rezin je opaziti večje temne celice, vendar ne le pri rezinah, kjer smo hibridizirali s sondami za PVY ampak tudi pri kontrolnih rezinah, kjer smo uporabili nesmiselno sondo. Pri tem gre za nespecifično obarvanje delov celic, ki so značilne le za z virusom okuženo tkivo. Kolenhim je nespecifično obarvan z barvilo NBT/BCIP. Pri rezinah neokuženih rastlin krompirja ni opaziti velikih obarvanih celic, obarvan pa je kolenhim. Borlido in sod. (2002) navajajo, da se NBT veže na ksilemske sekundarne stene. V ta namen DeBlock in Debrouwer (1996) priporočata dodatek polivinil alkohola barvnim raztopinam, ki prepreči difuzijo intermediatov reakcije. Na preparatih nismo opaziti specifičnega obarvanja, ki bi bilo posledica vezave sonde na virusno RNA. Večje temne celice so morda napolnjene s kalozo, s katero se rastline borijo proti virusu in mu preprečijo širjenje po rastlini (Iglesias in Meins, 2000). Pri odporni sorti krompirja so ob nastajanju poškodb Hinrich-Berger in sod. (1999) opazili gosto citoplazmo, brez centralne vakuole v celicah povrhnjice in v parenhimu blizu povrhnjice. Stene sosednjih celic so se sesedle, ker so protoplasti plazmolizirali. Okoli sesedlih celic so opazili nalaganje stene. Ti predeli so tudi močno avtofluorescirali, kar nakazuje na prisotnost kaloze in sekundarnih metabolitov. Ugotovili so tudi, da naj bi bili virusi omejeni le na te predele. Tudi naše temne celice so bile močno obarvane in goste, kar bi lahko razložili z odebilitvijo sten in zgostitvijo citoplazme. Vendar pa bi to obarvanje tudi prikrilo signal sonde, če bi se vezala na virus, ki naj bi bili v teh predelih.

Preizkusili smo še metodo hibridizacije *in situ* na svežih rezinah rastlin krompirja po Borlido in sod. (2002). Za fiksacijo smo uporabili Histochoice MB (Amresco). Postopek je bistveno enostavnejši od klasičnega postopka, saj se izogne grobim postopkom, ki poslabšajo morfologijo tkiva. Tkiva se tako ne dehidrira in vklaplja v vosek, kar omogoča boljšo penetracijo sonde. Poleg tega se pri postopku ne uporablja objektnih stekel s poli-L-lizinom, ampak poteka vse v mikrotiterskih ploščah, s čimer se izognemo signalu ozadja zaradi vezave različnih reagentov na objektna stekelca. Kljub temu, da so rezine debelejše, se še vedno dobro ločijo morfološke strukture. Rezultati so pokazali specifično obarvanje celic pri rezinah okuženih rastlin krompirja, medtem ko teh obarvanih celic ni bilo na preparatih rezin neokuženih rastlin. Te celice pa so le na nekaterih preparatih rezin okuženih rastlin. Tudi v preparatih, kjer smo hibridizirali z nesmiselno sondijo, jih ni opaziti. Tako lahko sklepamo, da je to signal sonde, ki se je vezala na virus PVY. Tudi Rajamäki in Valkonen (2003) so ugotovili, da se signal pojavlja zelo lokalno. Samo določeno število žilnih celic in celic mezofila v okolini žil je bilo obarvanih, medtem ko okoliška tkiva niso bila obarvana. Obarvana območja naj bi bila središča sistemske okužbe, kar predstavlja zgodnjo fazo okužbe. Signal so opazili le na redkih vzorcih listov ki so jih analizirali. S protitelesi so zaznali centre okužbe le v 5 vzorcih listov od 53-ih pregledanih in v drugem primeru v 4 od 15-ih pregledanih.

Krzymowska in Hennig (1997) sta z metodo odtisa na membrano zaznala močnejši signal v povrhnjici in floemu. Ding in sod. (1998) so ugotovili da je s tobamo- in potivirusi največkrat okužen žilni parenhim. Petrovič in sod. (1995) so z ELISA testom merili vsebnost virusa v različnih delih rastline. Po štirih tednih po mehanski inokulaciji je bilo v spodnjih listih 518 µg virusa na gram sveže teže tkiva, medtem ko ga je bilo v zgornjih listih le 31 µg/g, v koreninah pa ga niso zaznali. Pri sekundarno inficiranih rastlinah so po treh tednih rasti v listih zaznali 334 µg/g, v steblih 288 µg/g in v koreninah 76 µg virusa na gram sveže teže tkiva. Tudi mi smo večinoma opazovali prisotnost virusa v spodnjih neinokuliranih listih ali pa v steblu, torej tam kjer naj bi bilo virusa največ.

Posthibridizacijsko tiramidno ojačanje signala po Webb in sod. (1999) ne povzroči višjega signala pri uporabi že optimiziranih pogojev. Razlike je opaziti pri neoptimizirani proteinazni razgradnji. Tako je najbolj uporabno ojačanje, ko je število molekul poročevalk omejeno. V našem poskusu, kjer smo uporabili tiramidni sistem za ojačanje signala, nismo opazili specifičnega signala hibridizacije. Morda so bili pogoji hibridizacije tako že optimizirani, le tarč v rezinah je bilo premalo ali pa niso dostopne, da bi jih lahko zaznali.

5.2 Sklepi

Potrdili smo, da so oligonukleotidne sonde primerne za lokalizacijo in detekcijo virusne RNA. Fluorescentno označene sonde, ki svetijo podobno kot fluorescensa tkiva niso primerne za uporabo v rastlinskih tkivih. Smiselna je uporaba tako smiselnih kot tudi protismiselnih sond, saj s tem lahko detektiramo tako pozitivno verigo RNA, kot tudi negativno verigo RNA, ki je prisotna ob podvojevanju virusa in lahko s tem detektiramo lokacijo podvojevanja.

Hibridizacija točkovnega odtisa se je izkazala za zelo uporabno metodo za testiranje vezave sonde na tarčna zaporedja, saj smo uspešno detektirali tudi negativno verigo RNA.

Ugotovili smo, da z lovljenjem virusnih delcev na protitelesa ne moremo uloviti dovolj virusa, da bi lahko RNA zaznali s hibridizacijo točkovnega odtisa. Za testiranje sond je tako potrebno izolirati celokupno RNA. Izkazalo se je, da tudi koncentriranje ne poveča zadostno koncentracije virusne RNA. V enem izmed poskusov se je celo izkazalo, da smo v neprecipitiranih vzorcih z elektroforezo zaznali virusno RNA, medtem ko v precipitiranih ne.

Za odprtje plaščnega proteina se je izkazala kot najbolj učinkovita uporaba pronaze E pri sobni temperaturi s 30 minutno inkubacijo. Ugotovili smo, da je za uporabo na tkivnih rezinah, pri katerih se še ohrani morfologija tkiva, primerna 125 µg/ml koncentracija pronaze E.

Izkazalo se je da je metoda hibridizacije in situ na svežih rezinah zelo uporabna, saj je edina dala specifični signal in je enostavnejša od hibridizacije na parafinskih rezinah, pri dovolj velikih rezinah tkiva. Pri majhnih je težja manipulacija in tkivo se slabše ohrani. Tirnidni sistem za ojačanje signala ni prispeval k boljšem signalu. Pri tkivu okužene rastline smo opazili večje temne celice, tudi na hibridiziranih prepraratih. Ugotovili smo, da se virusi prisotnost virusov le v posameznih celicah.

6 POVZETEK (SUMMARY)

Krompir napadajo številni povzročitelji bolezni. Med virusi je PVY eden izmed ekonomsko najpomembnejših. Spada v družino Potyviridae, ima pozitivno verižno RNA dolgo 9,7 kb, ki jo obdaja približno 2000 kopij plaščnega proteina. Obstajajo različne metode za njegovo detekcijo v rastlinah krompirja. Razširjanje in podvajanje virusa je mogoče spremljati s hibridizacijo *in situ*. Hibridizacija temelji na tem, da se označena krajsa zaporedja nukleinskih kislin vežejo s komplementarnim zaporedjem DNA ali RNA, nato pa s pomočjo označevalcev zaznamo mesto tarčnih nukleinskih kislin v tkivu.

V diplomskem delu smo želeli lokalizirati virus PVY^{NTN} v različnih delih rastline z metodo hibridizacije *in situ*. V ta namen smo uporabili rastline iz tkivne kulture stalno okužene z virusom in rastline iz gojene v rastni komori naknadno okužene z virusom. Pripravili smo sveže tkivne rezine, fiksirane v fiksativu Histochoice, in parafinske rezine tkiva fiksiranega v FAA ali 4 % paraformaldehidu.

In vitro smo preizkusili različne postopke za odpiranje plaščnih proteinov virusa: obdelava virusnih delcev z visoko temperaturo (70 °C), ter razgradnja s proteinazami pri različnih temperaturah. Uspeh odpiranja proteinskega plašča smo preverili z metodo RT-PCR v realnem času. Najprimernejši tretma za odprtje plaščnega proteina je bil inkubacija s pronazo E na sobni temperaturi 30 minut.

V prvih poskusih hibridizacije virusne RNA *in situ* smo uporabili fluorescentno označene sonde, ki se jih uporablja za PCR, vendar nas je motila autofluorescensa tkiva, ki zakrije morebiten signal sonde. Zato smo se odločili za sonde označene z digoksigeninom. Načrtovali smo protismiselne oligonukleotidne sonde označene z digoksigeninom proti pozitivni verigi RNA (prevladujoča oblika), smiselne (proti negativni verigi) in nesmiselne sonde (ne vežejo se na nobeno od verig virusne RNA). Po hibridizaciji *in situ* smo hibridizirana mesta zaznavali z uporabo protiteles proti digoksigeninu, ki so bila konjugirana z alkalno fosfatazo. Vezavo protiteles na digoksigenin smo zaznali s pomočjo kromogenega substrata za alkalno fosfatazo NBT/BCIP. Produkt reakcije smo kot vijolično obarvanje opazovali pod svetlobnim mikroskopom.

Da bi preverili vezavo sond na virusno RNA, smo naredili poskuse hibridizacije točkovnega odtisa na membrano. Na membrano smo nanesli vzorce izolirane virusne RNA oziroma virusnih delcev. Potrdili smo vezavo protismiselnih sond na virusno RNA, opazili pa smo tudi šibkejši signal s smiselnimi sondami, saj je v času transkripcije prisotna tudi negativna veriga. S hibridizacijo *in situ* smo opazili specifično obarvanje le v svežih tkivnih rezinah, fiksiranih v fiksativu Histochoice. Na nekaterih rezinah peclja in stebla okuženih rastlin smo opazili posamezne vijolično obarvane celice. Na rezinah,

hibridiziranih s smiselno ali nesmiselno sondom, ter na rezinah kontrolne neokužene rastline hibridiziranih s protismiselno sondom, takih celic nismo opazili.

7 VIRI

1. Anžlovar S., Kovač M., Ravnikar M. 1996. Photosynthetic Pigments in Healthy and Virus-infected Potato Plantlets (*Solanum tuberosum* L.) Grown in vitro. Phyton 36, 2: 221-230
2. Autofluorescence:Causes and Cures. 2006. Wright, Cell Imaging Facility, Toronto Western Research Institute, University Health Network.: 7 str. <http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/PDF/Autofluorescence.pdf> (4.4.2006)
3. Borlido J., Pereira S., Ferreira R., Coelho N., Duarte P., Pissarra J. 2002. Simple and fast *in situ* hybridization. Plant Molecular Biology Reporter, 20: 219-229
4. Brunt A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Potato Y potyvirus. Version: 20th August 1996.
<http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr65> 2.htm (13.12.2006)
5. Bustamante P.I., Hull R. 1998. Plant virus gene expression strategies. Electronic Journal of Biotechnology 1, 2: 18 str.
6. Carrington J.C., Freed D.D. 1990. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. Journal of Virology 64: 1590-1597
7. De Bokx J.A., Huttinga H. 1981. Potato virus Y. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 242, CMI/AAB, Slough, England, 6 str.
8. Dermastia M., Ravnikar M., Kovac M. 1995. Increased cytokinin-9-glucosylation in roots of susceptible *Solanum tuberosum* cultivar infected by potato virus Y^{NTN}. Molecular Plant Microbe Interactions 8: 327–330
9. Ding S.X., Carter S.A., Deom C.M., Nelson R.S. 1998. Tobamovirus and Potyvirus Accumulation in Minor Veins of Inoculated Leaves from Representatives of the Solanaceae and Fabaceae. Plant Physiology 116: 125-136
10. Dolja V.V., Haldeman R., Robertson N.L., Dougherty W.G., Carrington J.C. 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. EMBO Journal 13: 1482–1491

11. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. 2005. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, California, ZDA: 1262 str.
12. Garcia-Castillo S., Marcos J.F., Pallas V., Sanchez-Pina M.A. 2001. Influence of the plant growing conditions on the translocation routes and systemic infection of carnation mottle virus in *Chenopodium quinoa* plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 229-238
13. Glais L., Tribodet M., Kerlan C. 2005. Specific detection of the PVY^N-W variant of *Potato virus Y*. *Journal of Virological Methods* 125: 131-136
14. Gruden K., Štrukelj B., Ravnikar M., Herzog-Velikonja B. 2000. A putative viral resistance-connected protein isolated from potato cultivar Sante resistant to PVY^{NTN} infection. *Phyton* 40: 191–200
15. Hinrichs-Berger J., Harfold M., Berger S., Buchenauer H. 1999. Cytological responses of susceptible and extremely resistant potato plants to inoculation with potato virus Y. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 143-150
16. Hsu Y.H., Annamalai P., Lin C.S., Chen Y.Y., Chang W.C., Lin N.S. 2000. A sensitive method for detecting bamboo mosaic virus (BaMV) and establishment of BaMV-free meristem-tip cultures. *Plant Pathology* 49: 101-107
17. Iglesias V.A., Meins F.Jr. 2000. Movement of plant viruses is delayed in a β -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *The Plant Journal* 21, 2: 157-166
18. Jacquot E., Tribodet M., Croizat F., Balme-Sinibaldi V., Kerlan C. 2005. A single nucleotide polymorphism-based technique for specific characterization of Y^O and Y^N isolates of Potato virus Y (PVY). *Journal of Virological Methods* 125: 83-93
19. Kogovšek P. 2004. Indukcija gena za protiglivni protein iz lanu. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 60 str.
20. Kogovšek P. 2007, "PCR v realnem času Ljubljana", Nacionalni inštitut za biologijo. polona.kogovsek@nib.si (osebni vir, 16. avg. 2007)

21. Krzymowska M., Hennig J. 1997. Simple and rapid technique to detect PVY presence in some *Solanaceae* plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19, 2: 95-99
22. Kus M. 1995. Investigations of the sensitivity of potato cultivars to tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY^{NTN}). EAPR Virology Section Meeting Bled, 18–22 : 135–138
23. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30, 6:1292–1305
24. Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič Stres H., Gruden K., Ravníkar M. 2004. Spread of potato virus Y^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 293-300
25. Mielke N., Schlatermund N., Mühlbach H.-P. 2006. A new bunyaviral-type plant virus associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). Genome organisation and detection of viral RNA by *in situ*- Hybridisation (ISH). *Plant Genetics*, Joined Conference of the German Genetics Society and the German Society for Plant Breeding, Kiel, Germany, 20-23 sept. 2006: 115
26. Milavec M., Ravníkar M., Kovac M. 2001. Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with potato virus Y^{NTN}. *Plant Physiol Biochem* 39: 891–898
27. Montgomery S. M. 2002. *In situ* hybridization.
http://osiris.rutgers.edu/~smm/in_situ_hybridization.htm (16.02.2006)
28. Mortimer-Jones S., Dwyer G.I., Jones R.A.C., Jones M.G.K. 2007. Localisation of viruses in tuber tissues of potato. The 13th European Association for Potato Research Virology Section Meeting, Scotland, 19. jun. 2007: str. 66
29. Murphy A.M., Carr J.P. 2002. Salicylic acid has cell-specific effects on Tobacco mosaic virus replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiology* 128: 552–563
30. Nass P.H., Domier L.L., Jakstys B.P., D'Arcy C.J. 1998. *In Situ* Localization of Barley Yellow Dwarf Virus-PAV 17-kDa Protein and Nucleic Acids in Oats. *Phytopathology* 88, 10: 1031-1039

31. Nikolić P. 2006. Optimizacija metode hibridizacije RNA *in situ* na parafinskih tkivnih rezinah lanu. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 92 str.
32. Petrovič N., Gruden K., Ravnikar M. 1995. Purification of potato virus Y^{NTN} from different plant material. Acta Chimica Slovenica 42: 425-430
33. Pompe-Novak M., Wrischer M., Ravnikar M. 2001. Ultrastructure of Chloroplasts in Leaves of Potato Plants infected by Potato Virus Y^{NTN}. Phyton. 41, 2: 215-226
34. Pompe-Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič-Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression pf potato (*Solanum tuberosum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology 67: 237-247
35. Rajamäki M.-L., Valkonen J.P.T. 2002. Viral GenomeLinked Protein (VPg) Controls Accumulation and Phloem-Loading of a Potyvirus in Inoculated Potato Leaves. MPMI 15, 2: 138-149
36. Rajamäki M.-L., Valkonen J.P.T. 2003. Localization of a Potyvirus and the Viral Genome-Linked Protein in Wild Potato Leaves at an Early Stage of Systemic Infection. MPMI 16, 1: 25-34
37. Riechmann J.L., Lain S., Garcia J.A. 1992. Review Article: Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology 73: 1-16
38. RNeasy Mini Handbook. 2001. Third Edition. Quiagen: 116 str.
http://www.mshri.on.ca/microarray/Protocol/1016272HBRNY_062001WW.pdf
(25.1.2007)
39. Roche Applied Science. 2002/2003. Nonradioactive *in situ* hybridization application manual.
http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS /In_Situ/InSi_toc.htm
(3.6.2007)
40. Ruzin S.E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford, Oxford University Press, Inc.: 322 str.
41. Singh M., Singh R.P. 1995. Digoxigenin-labelled cDNA probes for the detection of potato virus Y in dormant potato tubers. Journal of Virological Methods 52: 133-143

42. Singh M., Singh R.P. 1996. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. *Journal of Virological Methods* 60: 47-57
43. Schwarzacher T., Heslop-Harrison P. 2000. Practical *in situ* hybridization. 1. izdaja. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd: 250 str.
44. Seron K., Haenni A.L. 1996. Vascular movement of plant viruses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 9, 6: 435–442
45. TSATM Plus DNP (HRP or AP) System (17.1.2007). Tyramide Signal Amplification For Chromogenic In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. Renaissance, : 31 str.
http://las.perkinelmer.com/content/Manuals/MAN_TSAPlusDNPCromoInSitu.pdf
46. Tyramide Signal Amplification Kits. 2005. Molecular Probes, Inc : 6 str.
<http://130.15.90.245/methods/Invitrogen%20TSA.pdf> (22.1.2007)
47. Vozelj N. 2001. Širjenje krompirjevega virusa Y^{NTN} v različnih, za virus dovzetnih sortah krompirja. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 58 str.
48. Wang H.L., Sudarshana M.R., Gilbertson R.L., Lucas W.J. 1999. Analysis of cell-to-cell and long distance movement of Bean dwarf mosaic geminivirus-green fluorescent protein reporter in host and nonhost species: identification of sites of resistance. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12, 4:345–355
49. Ward C.W., Shukla D.D. 1991. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* 32: 269-296
50. Webb D.R., Bonfiglioli R. G., Carraro L., Osler R., Symons R. H. 1999. Oligonucleotides as Hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology* 89, 10: 894-901
51. Webster C.G., Wylie S.J., Jones M.G.K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science* 86, 12: 1604-1607
52. Winterhalter A.C. 2003. Potyvirus: genome structure, organisation, processing and possible functions of mature proteins. *Virology Down Under*.
<http://www.uq.edu.au/vdu/VDUPotyvirus.htm> (13.12.2006)

53. Zhou Y.H., Peng Y.H., Lei J.L., Zou L.Y., Zheng J.H., Yi J.Q. 2004. Effects of potato virus Y^{NTN} infection on gas exchange and photosystem 2 function in leaves of *Solanum tuberosum* L. *Photosynthetica* 42, 3: 417-423

ZAHVALA

Za vso spodbudo in strokovno podporo pri diplomskem delu ter za njegov hiter pregled se zahvaljujem mentorici prof. dr. Maji Ravnikar.

Za številne ideje in koristne nasvete, za pomoč pri delu v laboratoriju in vse napotke pri pisanju diplomskega dela ter odgovore na številna vprašanja se zahvaljujem somentorju dr. Alešu Kladniku.

Za spodbudo pri diplomskem delu ter za njegov hiter pregled se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Marini Dermastia.

Za izjemno hiter pregled diplomskega dela se zahvaljujem predsednici prof. dr. Marjani Regvar.

Za pomoč pri delu v laboratoriju in za odgovore na mnoga vprašanja se zahvaljujem Poloni Kogovšek

Dr. Maruši Pompe-Novak se zahvaljujem za vse ideje pri snovanju diplomskega dela.

Zahvalila bi se tudi družini, Primožu, prijateljem, ki so mi stali ob strani tekom študija.