

**NUKLEINSAV AMPLIFIKÁCIÓN ALAPULÓ ELJÁRÁSOK
TERVEZÉSE ÉS FEJLESZTÉSE NÖVÉNYI VÍRUSDIAGNOSZTIKAI
ALKALMAZÁSOKHOZ**

PhD értekezés tézisei

készítette: Szemes Marianna

témavezető: Dr Dorgai László

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány

Biotechnológiai Intézet

2001

1. Bevezetés

A haszonnövényeket fertőző virális kórokozók – köztük a szilvahimlő vírus (*Plum pox virus*, PPV) és a burgonya Y vírus (*Potato virus Y*, PVY) – jelentős károkat okoznak. A növények vírusok okozta betegségei nem gyógyíthatók, ezért a fő cél a megelőzés. A legfőbb terjesztő maga az ember: a mezőgazdaságra jellemző monokultúrák kiváló szaporodási lehetőséget biztosítanak a kórokozóknak, és a növényi szaporítóanyagok révén a vírusok új, még nem fertőzött területekre, akár más földrészekre is eljuthatnak. Ma már a szaporítóanyagok előállításának folyamatát, nemzetközi cseréjét és kereskedelmét szigorú előírások szabályozzák. A növényi anyagok szűrése a különösen veszélyes, karantén kórokozók közé tartozó vírusokra kötelező, mi több, a vírusmentesség igazolása csak az arra alkalmasnak nyilvánított eljárással lehetséges.

A gyakorlatban leginkább elterjedt, és általánosan elfogadott vírus-diagnosztikai módszerek főként az ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) technikán alapulnak. Ez nagyszámú növényi minta gyors és specifikus vizsgálatát teszi lehetővé, azonban a módszer érzékenysége, különösen az aktív növekedési perióduson kívül, nem mindig kielégítő.

A nukleinsav felszaporításon (amplifikáció) alapuló technikák lényegesen nagyobb érzékenységet biztosítanak, azonban költségesebbek, és a munka- és időigényük is nagyobb. A polimeráz láncreakción (PCR) kívül, alternatív nukleinsav amplifikációs technológiákat is alkalmaznak diagnosztikus célokra, mint például a NASBA-t (*nucleic acid sequence-based amplification*), melynek fő templátja az egyszálú RNS, ezért különösen alkalmas RNS vírusok kimutatására.

Az amplifikációs technikák rutin diagnosztikai célokra való alkalmazását számos kutatás-fejlesztési eredmény segítette elő: a minta előkészítés egyszerűsítése és automatizálása, egyetlen reakcióban több kórokozó jelenlétének vizsgálata (multiplex reakció), valamint a nukleinsav amplifikációval párhuzamos, valós idejű fluoreszcens kimutatási módszerek alkalmazása. Ez utóbbi fejlesztés lehetővé tette a felszaporodó termék zárt reakcióedényben történő, reakció közbeni detektálását, mely a kimutatás idejét, munkaigényét, valamint a munkaterület termék molekulával való szennyeződésének a veszélyét is jelentősen csökkentette.

A specifikus amplifikáció reakció közbeni követésének egyik lehetséges eszköze a molekuláris *beacon* (MB) próba. Az MB-k olyan strukturált oligonukleotidok, melyek 5'

végéhez egy *fluorophore*, a 3' véghez pedig egy fényelnyelő (ún. *quencher*) csoport kapcsolódik. A terminális részeken egymással komplementer szekvenciák találhatók, általában 5-7 nukleotid hosszúságban, melyek hibridizálása biztosítja a próba jellegzetes *stem-and-loop* struktúrájának (MB struktúra) kialakulását. Ennek következtében a *fluorophore* és a *quencher* csoport egymáshoz kellően közel kerül ahhoz, hogy gerjesztés hatására a *fluorophore* által elnyelt energia direkt transzfer útján a *quencher* csoportnak átadódjon, így a *fluorophore* csoport nem bocsát ki fényt. A célszekvenciával komplementer, 15-30 nukleotid hosszúságú szakasz az oligonukleotid középső részén helyezkedik el. A próba kötődése konformáció változást okoz: a terminális régiók hibridizációja megszűnik, ezért a *fluorophore* és a *quencher* csoport eltávolodik és gerjesztés hatására fényemisszió mérhető. Az MB próbákat mind PCR, mind NASBA reakciókban sikeresen alkalmazták az amplifikáció valós idejű követésére. Az MB termék-analízissel kombinált NASBA amplifikációt AmpliDet RNA-nek nevezik (*Amplification and Detection of RNA*). Az MB-k a lineáris próbákhoz képest nagyobb specifitással rendelkeznek és ezért kiválóan alkalmasak pont mutációk kimutatására. A megnövekedett specifitás termodinamikai modelljét is leírták.

A szilvahimlő a csonthéjas gyümölcsfák legjelentősebb virális betegsége. A század elején írták le Bulgáriában, azóta fokozatosan átterjedt az egész kontinensre, majd megjelent Észak-Afrikában, Észak- és Dél-Amerikában, valamint Ázsiában is. Az érzékeny fajokon, fajtákon jelentős termésvesztést, ill. a gyümölcsök deformálódását, foltosodását okozza. Biológiai és szerológiai tulajdonságok alapján a vírus négy törzsét különítették el (PPV-D, PPV-M, PPV-EA és PPV-C), melyek eltérő, bár fokozatosan átfedő földrajzi elterjedést mutatnak. A PPV kimutatására és tipizálására mind szerológiai, mind nukleinsav alapú diagnosztikai eljárásokat kifejlesztettek, azonban a vírus egyetlen diagnosztikai rendszerben történő kimutatása és a fertőző törzs azonosítása, bármely törzsbe tartozó izolátum esetén, nem volt megoldott.

A burgonya Y vírus kártékony és elterjedt kórokozó. Gazdaköre igen széles, a legjelentősebb károkat a burgonya, paradicsom, bors és dohány ültetvényekben okozza. A vírus számos változata ismert. A burgonyáról származó izolátumokat biológiai tulajdonságok alapján három törzsbe sorolták (PVY^N, PVY^O, PVY^C). A 80-as évek közepén

olyan, a PVY^N törzsbe tartozó vírusokat írtak le, melyek a burgonya gumók felszínén nekrotikus gyűrűket (gumónekrózis) hoznak létre és a korábban rezisztens fajtákat is képesek megfertőzni. A víruscsoportot PVY^{NTN}-nek nevezték el. A virális törzsek szerológiai is elkülönülnek, habár a biológiai osztályozással való korreláció nem tökéletes. Az egyes törzsek, ill. izolátum csoportok eltérő biológiai tulajdonságaiért felelős genom régiókat még nem azonosították. A PVY^{NTN} izolátumok specifikus kimutatása a karantén intézkedések végrehajtása miatt különösen fontos, azonban ezen izolátumok a többi PVY^N vírustól sem szerológiai sem dohány indikátorművenyeken végzett biológiai tesztekkel nem különíthetők el. A gumónekrózist okozó patotípus és egy, a köpenyfehérje kódoló régióban található génátrendeződés között korrelációt írtak le.

Mind a PPV, mind a PVY a Potyvírusok közé tartozik, melyekre egy szegmensből álló, egyszálú, pozitív *sense* RNS genom jellemző.

A vírusok változatos és változékony kórokozók. Megbízható diagnosztikai eljárások kidolgozásához szükséges a biológiai, szerológiai és molekuláris tulajdonságaik jellemzése, és a szekvenciák filogenetikai analízise. A nukleinsav amplifikáción alapuló módszerek tervezésénél, az oligonukleotid primerek ill. próbák célrégiójának kiválasztásában a vírus-specifikus tényezők mellett a szekvencia jellegzetességeit is figyelembe veszik.

Az oligonukleotidok kötődésének stabilitását a kialakuló duplex olvadási hőmérsékletével (T_m), valamint az adott hőmérsékleten, a duplex kialakulását kísérő *standard* szabad energia változással (ΔG°) jellemezhetjük. Ezen paraméterek eddigi legmegbízhatóbb predikcióját a *nearest-neighbor* (NN) modell szolgáltatta. A modell érvényességét demonstrálták DNS-DNS, RNS-RNS, és RNS-DNS heteroduplexek esetén, valamint az egy nukleotid eltérést (*mismatch*) tartalmazó DNS duplexeknél. Az elvet kiterjesztették a DNS ill. RNS másodlagos struktúrák stabilitásának predikciójára, és felhasználták komplex rendszerek jellemzésére, mint pl. a strukturált próbák kötődési erősségének a jellemzéséhez strukturált célmolekulák esetén. Mindazonáltal, az oligonukleotid primerek és próbák tervezésénél, így az MB próbák esetében is, gyakran alkalmaznak tapasztalati szabályokat.

2. Célkitűzések

1. Egy olyan PPV diagnosztikai eljárás kidolgozását tűztük ki célul, amely érzékeny és alkalmas bármely vírustörzs specifikus azonosítására is. Évente igen nagyszámú szaporítóanyag minta szűrésére van szükség, ezért fontosnak tartottuk, hogy az eljárás eleget tegyen a rutin tesztelés támasztotta követelményeknek, mint amilyen a gyorsaság, egyszerűség és a nagyszámú minta időegység alatti analízisének lehetősége.
2. A burgonya Y vírus kimutatására és tipizálására, beleértve a gumónekrózist okozó patotípus specifikus detektálását is, egy érzékeny és nagyszámú minta gyors vizsgálatára alkalmas diagnosztikai eljárást terveztünk kidolgozni.
3. Az AmpliDet RNA kiválóan alkalmas RNS célmolekulák érzékeny, specifikus, és gyors kimutatására. A különböző diagnosztikai eljárások eltérő specifitást igényelnek: cél lehet egyetlen nukleotid eltérés kimutatása, de akár egy vagy több *mismatch* tolerálása is. Az MB próbák kötődésének stabilitása és a próbák specifitása a reakció körülményei között kevésbé jellemzettek. Az AmpliDet RNA több szempontból is speciális környezetet jelent: a kötődés eredményeképpen RNS-DNS heteroduplex alakul ki, a reakcióelegy nagy mennyiségű, az olvadási hőmérsékletet csökkentő dimetilszulfoxidot (DMSO) tartalmaz, és a próba – valamint potenciálisan a célmolekula is – erős másodlagos szerkezettel bír. Ezért célul tűztük ki az MB próbák kötődési tulajdonságainak és specifitásának jellemzését az AmpliDet RNA körülményei között, továbbá egy, az említett tulajdonságok predikálására alkalmas módszer kidolgozását.

3. Az alkalmazott módszerek rövid összefoglalása

- Általános molekuláris biológiai módszerek
A dolgozatban bemutatott munkához széles körben használtuk a molekuláris biológia általános módszereit, úgymint nukleinsavak izolálása, klónozása, restrikciós enzimekkel történő analízise és szekvenciájuk meghatározása. Az alábbiakban néhány, a munkához specifikusan kapcsolódó módszert külön is kiemelünk.
- Amplifikációs módszerek
A munka során PCR, RT-PCR és NASBA amplifikációs reakciókat alkalmaztunk.

- **Fluoreszcens detektálás**

A molekuláris *beacon* próbák gerjesztését, és az általuk kibocsátott fény mérését Applied Biosystems Prism 7700, valamint Fluoroskan FL fluoriméter készülékek segítségével végeztük.

- **RNS célmolekula *in vitro* előállítás**

Az RNS *in vitro* szintézisét kettősszálú DNS templátot használva T7 RNS polimeráz segítségével végeztük. Az egyetlen nukleotid eltérést tartalmazó molekulákhoz a templát DNS-t egymással átfedő oligonukleotidok által irányított mutagenézissel állítottuk elő.

- **Szekvencia analízis, predikció**

A GCG 8.0, és a Phylip programcsomagokat, valamint a CLUSTALW és a SimPlot programokat használtuk összehasonlító és filogenetikai analízis céljára. Az oligonukleotid primerek és próbák kötődési stabilitásának predikciójához az OLIGO 4.0, MFold, OligoWalk valamint saját készítésű programokat alkalmaztunk.

4. Eredmények

1. Integrált RT-PCR/nested PCR módszer kidolgozása a szilvahimlő vírus kimutatására és törzseinek elkülönítésére

- Az adatbankokban rendelkezésre álló köpenyfehérje (CP) szekvenciák alapján, a korábban antigén tulajdonságúnak leírt N-terminális régióban az egyes törzsekre jellemző aminosav mintázatokat azonosítottunk. Az ezeknek megfelelő nukleinsav szekvenciákhoz oligonukleotid primereket terveztünk. A vírus általános kimutatásához a fenti diagnosztikus régiókat határoló genomszakaszokban elhelyezkedő konzervált szekvenciákat választottunk ki, és azoknak megfelelően oligonukleotidokat szintetizáltuk. A fenti primerek használatával, az első, RT-PCR reakcióban kimutatható a vírus jelenléte, míg a reakcióterméken, mint templáton végrehajtott négy *nested* reakcióban meghatározható a fertőző izolátum típusa.
- A módszer működését, és az oligonukleotid primerek specifitását biológiailag jellemzett vírus izolátumokból tisztított RNS-en, ill. a virális CP-t kódoló klónozott cDNS-eken, mint templátokon, igazoltuk.

- A módszer érzékenységét 40 tünetes gyümölcsfáról begyűjtött minta tesztelésével ellenőriztük. A vizsgálat eredményét összehasonlítottuk egy korábban publikált, a virális genom 3' nem-kódoló régióját kimutató, PCR-alapú módszerrel kapott eredménnyel. Az új módszerrel negatívnak bizonyult mintákban a másik eljárás sem mutatta ki a vírus jelenlétét, míg ellenkező eset előfordult: a *nested* reakciókban kimutatható volt a vírusfertőzés.
- Az újonnan kifejlesztett differenciál-diagnosztikai módszer gyakorlati használhatóságának bizonyítására 92 további, főként Magyarországról származó PPV izolátumot tipizáltunk. Az izolátum gyűjtemény jelentős részénél a törzs-specifikus azonosítást a gyakorlatban használt ELISA ill. RsaI-RFLP módszerekkel is elvégeztük, és összehasonlítottuk a kapott eredményeket. A PCR és az ELISA módszerek az esetek 77,3 %-ban azonos, míg 20,5 %-ban konzisztens eredményt adtak (azaz a PCR kevert PPV fertőzést jelzett, és az ELISA ezek közül az egyik komponenst azonosította). Egy izolátum esetében a két módszer által adott törzsmeghatározás ellentmondó volt. A PCR és RFLP eljárások eredménye 91,7 %-ban azonos, 8,3 %-ban konzisztens volt.

II. *Multiplex AmpliDet RNA assay kidolgozása a burgonya Y vírus kimutatására és a fertőző izolátum jellemzésére*

- Elvégeztük a gumónekrozis patotípussal korrelációt mutató genomi régiót is tartalmazó, a PVY köpenyfehérjéjét kódoló szekvenciák filogenetikai analízisét. Mivel számos rekombináns izolátumot írtak le, a klaszterezést rövidebb, átfedő génszakaszokon végeztük. A PVY^{NTN} izolátumok CP-kódoló régiója, az elvárásoknak megfelelően, kiméra-jellegűnek bizonyult, amely létrejöhetett egy PVY^N és egy PVY^O típusú vírus rekombinációja eredményeképp. A feltételezett rekombináció töréspontja körüli PVY^N és PVY^{O/C} törzs-specifikus mintázatokat választottuk ki diagnosztikus célokra. A határoló genomrészekon konzervált szekvenciákat kerestünk a NASBA reakcióban alkalmazott oligonukleotid primerek tervezéséhez. Így a reakció során a megfelelő szakaszt bármely ismert PVY izolátum esetén felszaporítjuk. A csoport specifikus azonosítást a NASBA termékhez kapcsolódó MB próbákkal valósítottuk meg: két MB kötődik a feltételezett töréspont mindkét oldalán, mind a PVY^N-, mind a PVY^{O/C}-specifikus mintázatokhoz. A négy MB-hez négy különböző *fluorophore*

csoportot terveztünk, amely lehetővé teszi az egymás melletti detektálásukat, azaz a PVY fertőzés kimutatását és az izolátum tipizálását egyetlen reakcióban.

- A NASBA primerek és az MB próbák megfelelő specifikitását biológiailag jellemzett mintákkal igazoltuk. Az eljárás érzékenységét ismert mennyiségű, *in vitro* szintetizált RNS templátsorozattal határoztuk meg, és 10^2 RNS molekulának adódott.
- A próbák tervezésekor arra törekedtünk, hogy a cél régiójában előforduló kisebb variabilitás a törzs-specifikus kimutatást ne zavarja. Ezért, egyrészt két MB szekvenciáját módosítottuk ismert polimorfizmusok tolerálása érdekében, másrészt pedig a próbákat úgy terveztük, hogy várhatóan kötődjenek a cél régióban egy nukleotid eltérést mutató szekvenciákhoz. Mutáns célmolekulákkal vizsgáltuk a fluoreszcens jel intenzitását, azaz, hogy a próbák megfelelnek-e ennek az elvárásnak. Egy eset kivételével az MB-k tolerálták az egy nukleotid eltérést a tesztelt izolátumoknál.
- Négy MB alkalmazását az esetlegesen előforduló kevert fertőzések megbízható kimutatása tette szükségessé. A módszer működőképességét és megbízhatóságát mesterségesen előállított, több PVY típusra jellemző, kevert RNS-t tartalmazó mintákon igazoltuk.
- A gyakorlati alkalmazhatóság bizonyítására hat országból származó, 47 biológiailag jellemzett PVY izolátum analízisét végeztük el az újonnan kifejlesztett AmpliDet RNA módszerrel. Huszonhét PVY^{NTN}, 9 PVY^N, 8 PVY^O és 2 PVY^C vírust a módszer jól azonosított, míg az eredmény egy esetben eltért (PVY^N diagnózis PVY^{NTN} helyett).

III. MB próbák tervezése AmpliDet RNA assay-ben történő alkalmazáshoz

- Az AmpliDet RNA assay-ben alkalmazott MB próbák kötődési tulajdonságainak jellemzésére javasoltunk egy megközelítést, predikciójára pedig egy módszert, termodinamikai modellek felhasználásával.
- Azért, hogy a NASBA reakcióelegy, mint környezet hatását a nukleinsav hibridizációra minden szempontból figyelembe vehessük, az elegy egyes komponenseinek szerepét kísérletesen állapítottuk meg. Az eltérő kation koncentrációt, ill. hőmérsékletet a modellek nyújtotta extrapolációs lehetőségek szerint vettük figyelembe.

- Tizennégy MB esetben meghatároztuk a próba által kibocsátott fluoreszcencia intenzitását a hőmérséklet függvényében, cél RNS molekula jelenlétében ill. nélküle, és a mért adatokból kiszámítottuk az MB struktúra 'felnyílásának' ill. az MB-RNS kötődésnek az egyensúlyi állandóit, NASBA-szerű körülmények között. A kísérletesen meghatározott állandókból számított ΔG° értékeket összehasonlítottuk a predikált értékekkel, melyek, a rendszer komplexitásához képest, jó egyezést mutattak (10% körüli átlagos hibával).
- Az MB próbák AmpliDet RNA *assay*-ben való specifikitásának jellemzésére egy próbákból és RNS molekulákból álló kísérleti rendszert hoztunk létre. Hat, jelentősen átfedő hibridizáló régióval rendelkező próba specifikitását vizsgáltuk tökéletesen illeszkedő, ill. egy nukleotid eltérést tartalmazó templát molekulákkal. A mutáns RNS-ek két típusba tartoztak: az egyik csoport esetén a nukleotid szubsztitúció várhatóan relatíve stabil *mismatch*-et eredményezett, míg a másik erősen destabilizáló mutációt tartalmazott. A kísérleti rendszer célja az volt, hogy megfigyelhessük a kötődés specifikitásának a változását a hibridizáló régió hosszának, ill. az MB-RNS duplex stabilitásának függvényében, más tényezők, pl. másodlagos struktúrabeli különbségek hatásának a kizárásával. Kísérleteinkben fokozatos átmenetet figyeltünk meg a pont mutáció specifikitás, és a *mismatch* tolerancia között. Az átmeneti tartományban a próbák, az elvárásoknak megfelelően, a nukleotid eltérés típusától függően pozitív vagy negatív eredményt jeleztek.
- Vizsgáltuk néhány nukleotid analóg alkalmazási lehetőségét az MB próbák *mismatch* toleranciájának növelésére. A kísérleteinkben az inozin és univerzális purin analógok nem növelték jelentős mértékben a próbák *mismatch* toleranciáját. Az univerzális pirimidin analóg, ellenben, amennyiben a célmolekula purin nukleotidot tartalmazott a megfelelő pozícióban, erős kötődést és az analóg nélküli próba komplementer célmolekula jelenlétében mért fluoreszcenciájához képest alig csökkent erősségű jelet eredményezett.

5. Diskusszió

- A szilvahimlő vírus kimutatására és törzseinek elkülönítésére kidolgoztunk egy RT-PCR/nested PCR alapú diagnosztikai módszert, mely alkalmas a rutin szűrések által megkívánt nagyszámú minta vizsgálatára.
- Az eljárás érzékenysége – az RT-PCR/nested PCR kombinációnak köszönhetően – felülmúlta az összehasonlításhoz használt, publikált PCR-alapú PPV kimutatói módszert. A vírus törzsek azonosításában és a kevert fertőzések kimutatásában érzékenyebbnek bizonyult az elfogadott ELISA, ill. RsaI-RFLP módszereknél.
- A kifejlesztett PCR primerek igen jó specifitást mutattak, mind laboratóriumi körülmények között, mind pedig szabadföldi minták vizsgálata során. Kereszt és mellékreakciókat nem tapasztaltunk.
- Az eljárás megbízhatóságának tesztelése során megvizsgáltunk 92 főként Magyarországi eredetű, 1965 és 1991 között begyűjtött izolátumot. Az újonnan fejlesztett módszer adta törzs-specifikus diagnózis mind az ELISA, mind az RFLP analízis eredményeivel magas korrelációt mutatott.
- A PPV-D törzs előfordulási gyakoriságának ugrásszerű megnövekedését figyeltük meg az 1990 körüli periódusban, amely, vélhetően, a megváltozott irányú és nem megfelelően ellenőrzött növényi szaporítóanyag kereskedelem révén jutott az országba. (A PPV-D törzs korábban Nyugat- és Dél-Európában volt jellemző.)
- A burgonya Y vírus kimutatására és a fertőző izolátum jellemzésére egy multiplex AmpliDet RNA eljárást dolgoztunk ki. A módszer a köpenyfehérje kódoló régió specifikus mintázatai alapján különíti el a víruscsoportokat, melyek jó egyezést mutatnak a biológiai PVY^N, PVY^{O/C} és PVY^{NTN} típusokkal.
- A módszer érzékenysége messzemenően kielégíti a gyakorlat által támasztott követelményeket.
- Az eljárás adta tipizálás megbízhatóságát biológiailag jellemzett izolátumok vizsgálatával teszteltük. A 47 analizált vírus mintából a kifejlesztett eljárás 46-ot sikeresen azonosított, míg egy PVY^{NTN} izolátumot PVY^N-ként diagnosztizált. A kísérletes munka lezárása után számos, újonnan meghatározott PVY CP kódoló

szekvencia vált ismertté. Ezen izolátumok túlnyomó többségét a módszertünk helyesen azonosítaná. Egyes PVY^{NTN} izolátumok eltérő eredményt adnának, amely, a validációs kísérlet eredményével együtt, arra utal, hogy a génátrendeződés csak korrelál, de nincs okozati összefüggésben a patotípussal. Mindazonáltal, a módszer alkalmas a PVY vírusok tipizálására, és a gumónekrózist okozó izolátumok jelzésére is, bár kivételek előfordulhatnak.

- Az AmpliDet RNA *assay*, mint technika, a különféle *fluorophore*-okkal jelölt MB próbák alkalmazásával kiváló lehetőséget nyújt a multiplex kimutatásra. A kifejlesztett eljárásban négy eltérő fluoreszcens csoporthoz kapcsolódó próbát használtunk, és demonstráltuk, hogy ezek szignáljai tökéletesen elkülöníthetők. Az eljárás alkalmasságát kevert fertőzések detektálására igazoltuk.
- Mutáns célmolekulák használatával demonstráltuk, hogy a kifejlesztett próbák nagy valószínűséggel alkalmasak az egy nukleotid eltérést tartalmazó izolátumok detektálására is.
- Termodinamikai modellek és kísérletes eredmények felhasználásával javasoltunk egy módszert az MB struktúra és a célmolekulához való kötődés stabilitásának predikciójára, AmpliDet RNA *assay* körülményei között. A megközelített helytállóságát, ill. a predikált értékek megbízhatóságát kísérletesen ellenőriztük. A rendszer komplexitását és az alkalmazott modellek pontosságát figyelembe véve, a javasolt módszer jó és megbízható értékeket adott.
- A próbák specifikitásának a tesztelésére egy kísérleti rendszert dolgoztunk ki. Megfigyelhettük, hogy, habár mind a *stem-and-loop* struktúra stabilitását, mind a célmolekulához való kötődést jellemző szabad energia értékek a működőképes MB próbák esetén igen széles tartományban helyezkedtek el, ezen próbák specifikitása jelentősen különbözött. Demonstráltuk a pont mutációk specifikus kimutatásának lehetőségét AmpliDet RNA *assay*-ben, még relatíve kevésbé destabilizáló nukleotid szubsztitúciók esetén is. Amennyiben a próba célmolekulához hibridizáló régiójának a hosszát növeltük, egy 'átmeneti tartományt' figyelhettünk meg, amikor a *mismatch* típusától erősen függött a próba kötődése. Az ennél stabilabb MB-k, várhatóan, bármely egyetlen nukleotid eltérést tolerálni képesek.

- Az univerzális pirimidin analóg kiválóan alkalmasnak bizonyult az MB próbák *mismatch* toleranciájának a növelésére. Demonstráltuk, hogy a kötődés erőssége bármely komplementer célmolekula esetén, alig csökken az analóg nélküli próba tökéletesen illeszkedő célmolekulához való kötődéséhez képest. Az analógot a PVY kimutatására és tipizálására kifejlesztett eljárásban is alkalmaztuk: az MB-O1 két P nukleotidot tartalmazott, és egy esetben demonstrálhatóan képes volt kötődni az egy nukleotid eltérés ellenére is.

6. A dolgozathoz kapcsolódó saját közlemények

- Kölber, M., Németh, M., Krizbai, L., Szemes, M., Kiss-Tóth, E., Dorgai, L., Kálmán, M. Detectability of Prunus Necrotic Ringspot and Plum Pox viruses by RT-PCR, multiplex RT-PCR, ELISA and indexing on woody indicators. *Acta Horticulturae* 1998 472:243-247.
- Szemes, M., Kálmán, M., Myrta, A., Boscia, D., Németh, M., Kölber, M., Dorgai, L. Integrated RT-PCR/nested PCR diagnosis for differentiating between subgroups of *Plum pox potyvirus*. *Journal of Virological Methods* 2001 92:165-175.
- Szemes Marianna, Kálmán Miklós, Arben Myrta, Donato Boscia, Németh Mária, Kölber Mária és Dorgai László: A szilvahimlő vírus kimutatására és törzseinek az elkülönítésére szolgáló PCR alapú diagnosztikai rendszer kifejlesztése és gyakorlati kipróbálása. *Növényvédelem* 2000 36(11):561-571.
- Szemes, M., Schoen, C.D., van der Wolf, J.M. Molecular beacons for homogenous real time monitoring of amplification products. 5th Supplement to the *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishers (in press)
- Szemes, M., Klerks, M.M., van den Heuvel, J.F.J.M., Schoen, C.D. Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for the simultaneous detection and typing of PVY isolates. *Journal of Virological Methods* (accepted for publication)

Szabadalmi bejelentés:

- Dorgai László, Szemes Marianna, Kálmán Miklós, Kölber Mária: Integrált RT-PCR/nested PCR módszer a szilvahimlő kimutatására és alcsoportjainak megkülönböztetésére.

Magyar szabadalmi bejelentés. Hivatkozási szám: P-9901594

Konferencia előadások, poszterek:

- Krizbai, L., Kiss-Tóth, E., Szemes, M., Kálmán, M., Kölber, M., Németh, M. Preliminary results about detection of *Plum pox virus* by RT-PCR using different RNA preparation methods.
Conference on Plum Pox. 1996 Budapest (poszter).
- Kölber, M., Németh, M., Krizbai, L., Szemes, M., Kiss-Tóth, E., Dorgai, L., Kálmán, M. Szilvahimlő vírus és gyűrűsfoltosodást okozó szilvavírus kevert fertőzésének kimutatása multiplex RT-PCR módszerrel.
43. Növényvédelmi Napok. 1997 Budapest (előadás).
- Szemes, M., Kálmán, M., Kölber, M., Dorgai, L. Integrated RT-PCR/nested PCR diagnosis for differentiating among subgroups of *Plum pox potyvirus*.
Mass Scale Diagnosis of Plant Pathogens by Nucleic Acids Amplification Methodologies. COST 823 Meeting. 1998 Faro, Portugália (poszter).
- Szemes, M., Klerks, M.M., van den Heuvel, J.F.J.M., Schoen, C.D. Development of an AmpliDet RNA assay for the specific detection of PVY^{NTN}.
EPPO conference. 2000 Wageningen, Hollandia, (előadás)
- Szemes, M., Kálmán, M., Myrta, A., Boscia, D., Kölber, M., Dorgai, L. Integrált RT-PCR/nested PCR diagnosztikai rendszer a szilvahimlő vírus kimutatására és alcsoportjainak az elkülönítésére.
46. Növényvédelmi Napok. 2000 Budapest (előadás).

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr Dorgai Lászlónak a témavezetésért és a munkámhoz nyújtott folyamatos szakmai támogatásáért. Köszönettel tartozom Dr Kálmán Miklósnak és a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítványnak, hogy PhD hallgatóként részt vehettem az intézetben folyó színvonalas munkában.

Hálával tartozom Dr Cor D. Schoennak (Plant Research International, Wageningen, Hollandia), akinek révén megismerkedhettem a növényi vírusdiagnosztika legújabb kutatási eredményeivel, és Dr Harm Huttinga-nak, aki lehetővé tette, hogy bekapcsolódjak az intézetben folyó magas szintű kutatásokba.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr Kölber Máriának (Pest Megyei Növényegészségügyi és Talajvédelmi Állomás), amiért a növényi vírusokkal kapcsolatos szaktudását és tapasztalatait megosztotta velem, valamint a jóindulatáért és segítségéért.

Szeretném még kifejezni a hálámat a munkatársaimnak, akiknek nagyon sokat köszönhetek, közöttük is Vörös Andreának, Bálint Arankának, Dr Kiss-Tóth Endrének, Szameczné Rutkai Editnek és Szamecz Bélának a Bay Zoltán Intézetből, valamint Michel M. Klerksnek, Dr Jan van der Wolfnak és Jose von Beckhovennek a Plant Research International intézetből.

Köszönöm a világ különböző részein élő, számos kollégának, név szerint, Dr Thierry Candresse-nek, Dr Palkovics Lászlónak, Dr Lev Nemchinovnak, Dr Wolf Istvánnak, Dr Steen Nielsennek, Dr Rudra P. Singh-nek, hogy hozzájárultak az általuk leírt vírus izolátumok vizsgálatához, és rendelkezéseimre bocsátottak azokat. Hasonlóképpen köszönettel tartozom Dr Jan van der Wolfnak és Michel M. Klerks-nek, az általuk tervezett és szintetizált molekuláris *beacon* próbákért.

Köszönöm az Isogen Bioscience BV és az Organon Teknika vállalatok (Hollandia) munkatársainak, hogy rendelkezésünkre bocsátottak molekuláris *beacon* próbákat, ill. NASBA reagenseket, lehetővé téve számos kísérlet elvégzését.