

Miro Saarela

PERUNAN VIRUSTESTAUSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN

PERUNAN VIRUSTESTAUSMENETELMÄN KEHITTÄMINEN

Miro Saarela
Opinnäytetyö
Kevät 2016
Laboratorioalan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma, bioteknologian suuntautumisvaihtoehto

Tekijä: Miro Saarela

Opinnäytetyön nimi: Perunan virustestausmenetelmän kehittäminen

Työn ohjaaja: Lea Hiltunen, Elina Virtanen, Eija Hakala

Työn valmistumislukukausi- ja vuosi: Kevät 2016

Sivumäärä: 36 + 20

Luonnonvarakeskuksessa käytössä olevassa menetelmässä ELISA-testissä tehtäviin virusanalyysiin käytetään lehti- tai versomateriaalia. Mukulanäytteet idätetään kasvihuoneessa, ja itujen annetaan kasvaa taimiksi. Opinnäytetyön tavoitteina oli tutkia, voitaisiinko analyysijä nopeuttaa käyttämällä testaukseen versomateriaalin sijaan pimeässä kasvatettuja ituja, miten mukuloiden esikäsittely vaikuttaa pimeässä itämiseen ja onko itutestaus yhtä luotettava menetelmä kuin versoista tehtävä testaus. Muita työn tavoitteita olivat perunan Y-, A-, M-, S- ja X-virusten toteamisrajojen määrittäminen ELISA-testaukseen, luotettavan näytelaimennossuhteen tutkiminen, uuden monileimalukijan käyttöönotto sekä aiempien virus- ja bakteerianalyysointitulosten kokoaminen yhteen

Mukuloille tehtiin erilaisia esikäsittelyitä, jonka jälkeen mukuloita idätettiin pimeässä. Vertailuna käytettiin mainittua käytössä olevaa kasvihuonekasvatusta. Itujen ja versojen kasvua seurattiin ja lopuksi niistä tehtiin Y-virustestaus. Toteamisrajojen määrittämistä varten tehtiin virusinokulointi isäntäkasveihin, joista virus myöhemmin puhdistettiin. Puhdistetun viruksen pitoisuus määritettiin ja viruksesta tehtiin standardikäyrä ELISA-testiin, jonka jälkeen laskettiin viruksen toteamisrajat. Luotettavaa Y-virusnäytelaimennossuhdetta etsittiin laimentamalla positiiviseksi tiedettyä näytettä ELISA-testiin.

Käytössä olevalla kasvihuonekasvatuksella saatiin nopeammin riittävä määrä kasvimateriaalia virustestaukseen kuin pimeäidätyksellä. Korkeampi gibberelliinihappopitoisuus mukuloiden esikäsittelyssä nopeutti pimeässä itämistä enemmän kuin matalampi pitoisuus. Mukuloiden halkaisu ennen gibberelliinihappokäsittelyä nopeutti itujen kasvua kokonaisuutena käsiteltyihin mukuloihin verrattuna. Itutestauksen luotettavuuden tutkiminen ei onnistunut, koska käytössä olleissa mukuloissa ei ollut tarpeeksi virusta. Ainoastaan X-virusta saatiin lisättyä isäntäkasveissa, joten se oli ainoa virus, josta määritettiin toteamisrajat. Y-virusnäytelaimennossuhdetta tutkittaessa kyseistä näytettä voitiin laimentaa yli 1000-kertaisesti niin, että virus oli vielä havaittavissa testauksessa. ELISA-testissä käytettävä uusi monileimalukija otettiin käyttöön ja sille tehtiin käyttöohjeet. Aiempien virus- ja bakteeritulosten kokoaminen yhteen saatiin valmiiksi suunnitelman mukaisesti.

Opinnäytetyö tehtiin Luonnonvarakeskuksen agrobiotekniikkatiimissä molekyylibiologian laboratoriossa Oulussa.

Asiasanat: ELISA, gibberelliinihappo, peruna, virus, PVY, PVX

ALKUSANAT

Kiitän Elina Virtasta opinnäytetyön mahdollistamisesta ja siihen vaadittavista järjestelyistä, Lea Hiltusta työn ohjaamisesta ja Anne-Maria Möttöstä käytännön opastamisesta laboratoriossa. Lisäksi kiitän tiimin muita henkilöitä Jani Kelloniemeä, Tiina Väyrystä ja Tapio Uotilaa saamastani avusta. Kiitos kuuluu myös Jari Valkoselle asiantuntija-avusta virusinokuloinnissa ja -puhdistuksessa sekä Oulun yliopiston biokemian laitokselle mahdollisuudesta käyttää ultrasentrifugia.

Oulussa 13.4.2016

Miro Saarela

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ.....	3
ALKUSANAT	4
SISÄLLYS.....	5
1 JOHDANTO.....	6
2 PERUNAN VIRUKSET	7
2.1 Kasvivirukset.....	7
2.2 PVY eli perunan Y-virus	8
2.3 PVX eli perunan X-virus	9
3 ELISA-TESTI.....	10
3.1 DAS-ELISAn periaate.....	10
3.2 Virustestaus DAS-ELISALLA	11
4 IDÄTYSKOKEET	13
4.1 Mukuloiden esikäsitteleminen ja kasvuolosuhteet.....	14
4.2 Itämisen ja kasvun seuranta.....	15
4.2.1 Ensimmäinen idätyskoe	16
4.2.2 Toinen idätyskoe.....	18
4.1 Perunan Y-viruksen testaus idätyskokeiden versoista ja iduista	20
5 PERUNAN VIRUSTEN TOTEAMISRAJOJEN MÄÄRITYS DAS-ELISA-TESTIIN.....	21
5.1 Perunan virusten inokulointi eli tartutus isäntäkasveihin.....	21
5.2 Virusten puhdistus.....	22
5.2.1 PVY:n puhdistus	22
5.2.2 PVX:n puhdistus	23
5.3 Puhdistetun PVX:n pitoisuus ja puhtaus.....	24
5.3.1 Pitoisuuden määrittäminen UV-alueen absorbanssin perusteella	24
5.3.2 Pitoisuuden määrittäminen Bradfordin testillä	25
5.4 PVX:n toteamisrajan määrittäminen DAS-ELISA-testissä	27
5.5 Laimennustestaukset PVY-näytteestä.....	29
6 UUDEN MONILEIMALUKIJAN KÄYTTÖÖNOTTO.....	32
7 YHTEENVETO	33
LÄHTEET.....	35
LIITTEET	37

1 JOHDANTO

Luonnonvarakeskuksen Oulun laboratorio tarjoaa tutkimustoimintansa lisäksi palveluanalyysejä perunan viruksien, tyvimätäbakteerien sekä ulkoisen laadun määrittämiseen. Tässä opinnäytetyössä keskityttiin virusanalyysien kehittämiseen. Laboratoriossa käytössä olevassa menetelmässä perunan mukulat idätetään ja kasvatetaan taimiksi laboratorion erillään olevassa kasvihuoneessa. Nykyinen menetelmä vie paljon työaikaa ja aiheuttaa kustannuksia. Työssä tutkittiin, voitaisiinko analyyseja nopeuttaa ja helpottaa idättämällä mukuloita pimeässä kasvatuskaapissa ja käyttämällä saatuja ituja virustestaukseen. Gibberelliinihappokonsentraation vaikutusta dormanssin purkamiseen ja itujen kasvun edistämiseen vertailtiin useilla mukulaerillä.

Laboratoriossa virusten toteamiseen näytteistä käytetään yleisesti käytössä olevaa vasta-ainetunnisteista DAS-ELISA-menetelmää. Työn toisena pääosuutena olikin toteamisrajojen määrittäminen menetelmälle. Tähän kuului virusten lisäys isäntäkasveissa, niiden eristäminen ja saadun puhtaan viruksen käyttö toteamisrajojen määrittämiseen. Virustestausmenetelmään liittyen tehtiin myös testausta siitä, kuinka paljon näytettä voidaan laimentaa niin, että virus on vielä havaittavissa.

Työssä otettiin myös käyttöön uusi monileimalukija, jota käytetään ELISA-testissä absorbanssien mittaukseen. Laitteen ohjelmaan määritettiin tulostenkäsittelytavat DAS-ELISAlle. Lisäksi työhön kuului aikaisempien virus- ja bakteerianalyysitulosten kokoamista yhteen.

2 PERUNAN VIRUKSET

Viljellyn perunan viruksia tunnetaan noin 40 erilaista. Perunan virukset Y, A, M, S ja X sekä perunan kierrelehtisyysvirus ovat laajimmin levinneitä perunaa tartuttavia viruksia maailmassa. Nämä virukset leviävät kirvojen välityksellä lukuun ottamatta X-virusta, joka leviää kosketuksen kautta. (1, s. 619–621.) Virukset häiritsevät perunan kasvua, koska virusten lisääntyminen tapahtuu kasvin soluissa. Kasvi ei pysty muodostamaan yhteyttämistuotteita normaalisti, jolloin oireina ovat lehtien kirjavoituminen, laikkuisuus, kurttuisuus ja kuolioituminen. Virukset saattavat myös estää kasvin nestekiertoa tukkimalla johtojänteitä. Pahimmillaan virustaudit tappavat koko kasvin. Virustaudin oireet ovat yleensä pahemmat silloin, kun virusta on ollut valmiiksi jo mukulassa kuin silloin, kun tartunta saadaan vasta kasvukaudella. (2, s. 163.)

Yleisimmin virustartunta aiheutuu viroottisesta siemenperunasta (2, s. 164). Sertifioidun siemenperunan käyttö on vähentänyt virusten esiintymistä monilla alueilla maailmassa, mutta virukset aiheuttavat yhä uhan perunan tuotannolle (1, s. 619). Suomessa muun kuin sertifioidun eli virallisesti tarkastetun ja hyväksytyin siemenperunan markkinointi on pääsääntöisesti kiellettyä. Tarkastuksessa varmistetaan, että siemenperuna vastaa lainsäädännössä asetettuja vaatimuksia muun muassa kasvitautien osalta. (3, s. 5, 10–11.) Ennen kuin siemenperunan viruksiin kiinnitettiin tarpeeksi huomiota, olivat jotkut perunalajikkeet täysin virusten saastuttamia. Hyvässä tapauksessa virustartunta aiheuttaa vain vähäistä satotappiota, mutta pahimmillaan se voi johtaa koko sadon menetykseen. (4, s. 64.)

2.1 Kasvivirukset

Virukset koostuvat nukleiinihaposta ja sitä ympäröivästä proteiinikuoresta. Joillakin viruksilla oli lisäksi lipideistä ja proteiineista koostuva ulompi kalvo. Muodoltaan virusten päätyypit ovat pitkänomaiset helikaaliset virukset ja lähes pyöreähköt ikosahedriset virukset. Useimmiten kasvirusten nukleiinihappona on yksi yksijuosteinen RNA-molekyyli. (4, s. 53; 5.) Tässä opinnäytetyössä käytetyt perunan Y-, A-, M-, S- ja X-virukset ovat muodoltaan pitkänomaisia ja niiden nukleiinihappona on yksi yksijuosteinen RNA-molekyyli (6, s. 9–10, 19).

Virukset eivät pysty lisääntymään itsenäisesti, vaan ne ovat täysin riippuvaisia elävistä isäntäsoluista. Virukset eivät pysty tuottamaan energiaa tai proteiineja itse eivätkä liikkumaan itsenäisesti isännän ulkopuolella. Kasvirukset eivät pysty läpäisemään ehjää kasvin pintaa ja soluseinää, joten todennäköisesti virukset kulkeutuvat kohdista, jotka ovat vaurioituneet. Päästyään solulimaan virukselta poistuu kokonaan tai osittain sen proteiinikuori. (5.) RNA-viruksilla viruksen RNA kiinnittyy sitä lukeviin ribosomeihin. RNA:n geenien perusteella solulimassa valmistuu virukselle tarvittavia proteiineja, joista ensimmäiset ovat entsyymejä, joita tarvitaan viruksen RNA:n monistamiseen. (4, s. 54.) Lisäksi virus tarvitsee vähintään kuoriproteiinia ja liikkumisproteiinia, joka auttaa virusta pääsemään solusta toiseen. Kuoriproteiini muodostaa virukselle kuoren, johon RNA voi pakkautua. Näin muodostuu uusia viruskopioita. (5.)

Virukset voivat siirtyä solusta toiseen plasmodesmien eli soluja yhdistävien tiehyeiden kautta. Normaalisti plasmodesmien kautta kulkee kasvin molekyylijä. Liikkumisproteiinit muokkaavat plasmodesmiä niin, että virukset pääsevät kulkemaan sen läpi. Jotta virukset pystyvät valtaamaan koko kasvin, pitää niiden päästä sen nestekierto. Virukset liikkuvat passiivisesti johtosolukon siiväputkien nestevirtauksissa, joissa kulkee kasvin yhteyttämistuotteita. Tartuntakohdasta virus leviää yleensä juuriin, joista se kulkeutuu erityisesti kasvin kasvaviin osiin, joihin yhteyttämistuotteita kuljetetaan. (4, s. 55–57; 5.)

2.2 PVY eli perunan Y-virus

PVY on *Potyvirsten* suvun, suurimman kasvirivirusryhmän, tyypivirus. PVY leviää pysymättömästi monien kirvalajien välityksellä. Pysymättömässä leviämisessä PVY ei säily kirvassa tartutuskykyisenä kuin korkeintaan muutamia kymmeniä minutteja, mutta kirvan kasviin tekemät koepistot riittävät tartuttamaan viruksia kasvista kirvaan tai kirvasta kasviin vain muutamassa sekunnissa tai minuutissa. Siksi tärkeimmät kirvalajit viruksen leviämisen kannalta ovat usein sellaisia, jotka eivät asuta perunaa. (1, s. 626; 5, s. 59; 7, s. 16.) On havaittu, että alhainenkin siemenperunan PVY-saastunta saattaa johtaa moninkertaiseen saastunta-asteeseen viljelyksillä, joissa on runsaasti PVY:tä levittäviä kirvoja (7, s. 16).

PVY:llä on useita roturyhmiä. Niiden aiheuttama yliherkkyysovaste perunassa vaihtelee suuresti. (5, s. 66.) NTN-roto on noussut viime vuosina vallitsevaksi Suomessa, koska suurin osa perunalajikkeista ei ole ollut sille kestäviä (2, s. 163). PVY lienee taloudellisesti maailman haitallisin perunan virus (1, s. 626).



KUVA 1. Perunan Y-viruksen oireita (7)

2.3 PVX eli perunan X-virus

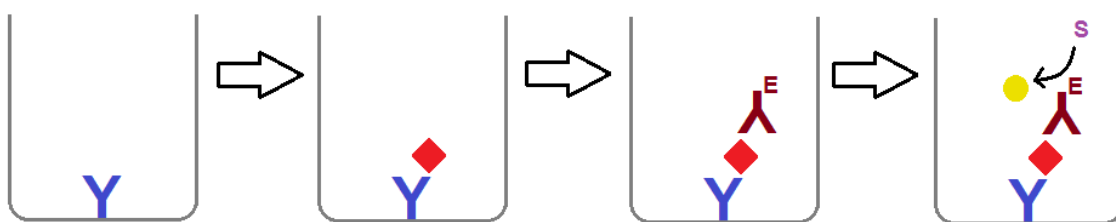
PVX on aiemmin ollut yleinen Suomessakin mutta nykyään se on pitkälti kadonnut ainakin ammattimaisessa perunanviljelyssä (2, s. 164). PVX eroaa useimmista muista perunan viruksista siinä, että se ei leviä kirvojen välityksellä, vaan kosketusvälitteisesti esimerkiksi kasvin lehtien hankautuksessa toisiaan vasten niin, että ne vahingoittuvat (1, s. 620; 5, s. 58). PVX on myös poikkeuksellisen kestävä moniin muihin viruksiin verrattuna, sillä se voi säilyä tartutuskykyisenä ihmisen iholla jopa viikon ajan, kun taas useimmat muut kasviruukset säilyvät tartutuskykyisinä enintään muutamia tunteja kasvisolujen ulkopuolella (5, s. 54).

3 ELISA-TESTI

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay eli ELISA on yksi laajimmin käytetyistä kasvivirusien diagnostisista testeistä (5). Vasta-ainetunnistukseen perustuvasta ELISAsta on useita muunnoksia, joista Double Antibody Sandwich - eli DAS-ELISAA käytetään tässä työssä. DAS-ELISAN periaate ja toteutus julkaistiin vuonna 1976 (9). ELISA-testaus perustuu vasta-aineiden kykyyn sitoutua antigeenien epitoppeihin. Useimmilla antigeeneillä on monia erilaisia epitoppeja. Monoklonaalinen vasta-aine (MAb) sitoutuu vain yhdenlaiseen epitoppiin, kun taas polyklonaalinen vasta-aine (PAb) on usean erilaisen vasta-aineen seos ja sitoutuu useisiin antigeenin eri epitoppeihin. (10, s. 259–260.)

3.1 DAS-ELISAN periaate

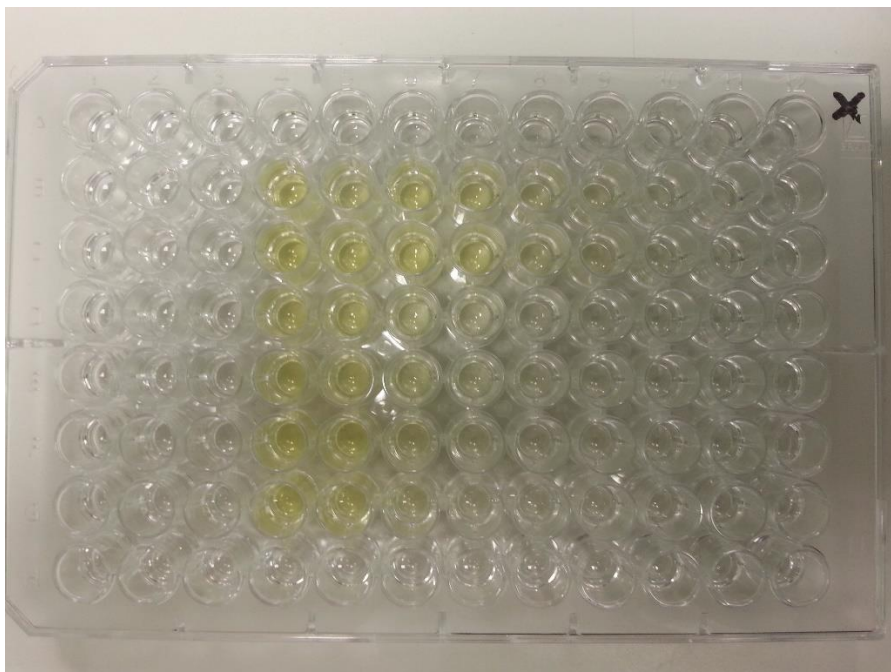
Testissä vasta-aineen annetaan adsorptoitua kiinteälle pinnalle kuoppalevyn kaivoihin. Kaivot pestään niin, että jäljelle jää adsorptoitunut vasta-aine. Kaivoihin lisätään näyte. Jos näytteessä on vasta-aineelle sopiva antigeeni, se kiinnittyy vasta-aineeseen. Kaivot pestään jälleen. Kaivoihin lisätään entsyymileimattua vasta-ainetta (konjugoitua vasta-ainetta), joka kiinnittyy antigeeniin. Kaivot pestään, ja niihin lisätään substraatti, joka hydrolysoituu entsyymin vaikutuksesta värilliseksi yhdisteeksi. Värien kehittymistä voidaan tarkkailla silmämääräisesti tai spektrofotometrillä. (9, s. 56.) (Kuva 2.)



KUVA 2. DAS-ELISAN periaate

Jokaiselle perunan virukselle on omat vasta-aineensa, joka on spesifinen kyseisen viruksen kuoren antigeenille. Jos näytteessä ei ole virusta, ei entsyymileimattu vasta-aine pysty kiinnittymään mihinkään vaan huuhtoutuu pois pesussa, eikä värireaktiota tapahdu. Vasta-aineina voidaan käyttää monoklonaalisia tai polyklonaalisia vasta-aineita. Tässä työssä käytössä olivat monoklonaaliset vasta-aineet. Konjugoitun vasta-aineen entsyyminä tässä työssä oli alkalinen fosfataasi ja

substraattina 4-nitrofenyylifosfaatti, joka emäksisissä olosuhteissa entsyymien vaikutuksesta hydrolysoituu keltaiseksi 4-nitrofenyyliksi (kuva 3).



KUVA 3. 96-kuoppalevy. Osaan kaivoista on lisätty vaihtelevia määriä PVX:ää.

Testissä tapahtuvan hydrolyysin määrä on verrannollinen levyllä olevan antigeenin määrään (9, s. 56).

3.2 Virustestaus DAS-ELISalla

Työssä käytetyt perunan virukset Y, A, M, S ja X testataan tavallisesti perunan lehdistä tai versoista. Kasvukaudella kasvamassa olevasta perunasta testaus on nopea, koska versomateriaalia saadaan heti kasvusta. Mukulasta viruksia testattaessa mukulat idätetään ja kasvatetaan riittävän suuriksi taimiksi. Kun näyte on valmiina, saadaan testaus suoritettua kahdessa päivässä.

DAS-ELISassa käytetyt liuokset on lueteltu liitteessä 1. Kuoppalevyn kaivoihin pipetoidaan 100 µl kouttauspuskuria, johon on laimennettu kouttausvasta-aine. Kuoppalevy peitetään kannella ja alumiinifoliolla ja sitä pidetään joko 4 °C:ssa yön yli tai 37 °C:ssa 4 h. Kaivot täytetään pesupuskurilla ensin kahteen kertaan, jonka jälkeen odotetaan 4 minuuttia. Tämän jälkeen kaivot täytetään pesupuskurilla vielä kerran ja odotetaan taas 4 minuuttia. Kaivot tyhjennetään mahdollisimman hyvin pesupuskurista.

Näytteet puristetaan mehupuristimella näytepuskuriin (suhteessa 1 osa näytettä, 2 osaa puskuria). Kuoppalevyn kaivoihin pipetoidaan tätä näytesuspensiota 99 µl. Näytteiden lisäksi kuoppalevylle lisätään myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit sekä yhdelle kaivoriville pelkkää näytepuskuria. Kuoppalevy peitetään kannella ja alumiinifoliolla ja sitä pidetään 4 °C:ssa yön yli. Kaivot pestään kuten aiemmin, mutta välissä odotetaan vain 3 minuuttia. Kaivoihin lisätään 100 µl näytepuskuriin laimennettua konjugaattivasta-ainetta. Kuoppalevy peitetään kuten aikaisemmin ja inkuboidaan 37 °C:ssa 1 h. Tämän jälkeen levy pestään kuten edellä. Kaivoihin lisätään 100 µl substraattiliuosta ja kuoppalevy laitetaan pimeään. Kuoppalevyn kaivojen absorbanssi mitataan aallonpituudella 405 nm ensimmäisen kerran 30 minuutin kuluttua. Mittauksia tehdään lisää säännöllisin väliajoin, kunnes positiiviset kontrollit ovat saavuttaneet absorbanssin 1. PVY:tä testattaessa värireaktio tapahtuu nopeasti, joten mittauksia ei yleensä tarvitse jatkaa tunnin jälkeen substraatin lisäyksestä. Muilla viruksilla värireaktion kehittymistä joudutaan odottamaan kauemmin.

Tämän opinnäytetyön tekemisen aikana mataliksi positiivisiksi tuloksiksi laskettiin ne näytteet, joiden absorbanssi oli $3 \times$ [negatiivisten kontrollien absorbanssien keskiarvo] ja positiivisiksi tuloksiksi ne näytteet, joiden absorbanssi oli $3 \times$ [negatiivisten kontrollien absorbanssien keskiarvo] + 0,05. Arvo 0,05 kuvaa hajontaa negatiivisten kontrollien välillä.

4 IDÄTYSKOKEET

Laboratoriossa käytössä olevassa menetelmässä perunan Y-, A-, M-, S- ja X-virukset testataan perunan versoista tai lehdistä. Jos näytteenä on mukula, se idätetään ja kasvatetaan riittävän isoksi taimeksi. Idätystä varten perunan itupäästä otetaan pariisinperunaraudalla pala, jota itämisen nopeuttamiseksi pidetään 10 mg/l gibberelliinihappossa 2 minuuttia. Gibberelliinihappokäsittelyn päämääränä on nopeuttaa mukuloiden itämistä. Pala istutetaan turpeeseen kasvihuoneelle (kuva 4).



KUVA 4. Perunan ituja ja versoja kasvamassa kasvihuoneella

Kokeissa verrattiin käytössä olevaa menetelmää siihen, että virustestaus tehtäisiin pimeässä kasvaneista iduista. Tarkoituksena oli verrata toisiinsa pimeässä kasvaneiden itujen ja kasvihuoneella

kasvaneiden versojen kasvunopeutta sekä gibberelliinihappokonsentraation vaikutusta itämiseen. Lisäksi tarkoituksena oli verrata itujen virustestauskelpoisuutta versoihin nähden.

4.1 Mukuloiden esikäsittely ja kasvuolosuhteet

Idätyskokeisiin valittiin kasvurytmiltään ja lepoajan pituudeltaan erilaisia perunalajikkeita. Valituista perunalajikkeista Siikli on kasvurytmiltään aikainen, Fambo melko aikainen ja Puikula myöhäinen lajike (11). Pimeäidätykseen laitettiin mukuloita kokonaisina ja veitsellä halkaistuina. Halkaistuista mukuloista idätykseen otettiin mukulan itupään sisältänyt pienempi osa, joka oli noin 1/3–1/4 koko mukulasta. Kokonaiset ja halkaistut mukulat esikäsiteltiin pitämällä niitä 10 tai 50 mg/l gibberelliinihappoliuoksessa tai vedessä. (Taulukko 1.) Vertailuna mukuloita laitettiin kasvamaan kasvihuoneelle. Niiden käsittelyyn käytettiin laboratoriossa käytössä olevaa vakiomenetelmää, joka on kuvailtu aiemmin.

TAULUKKO 1. Mukulaerien esikäsittelyt

Koe nro	Lajike	Laitettu itämään	Käsittely	Gibberelliinihappoliuoksen konsentraatio (mg/l)	Käsittely-aika gibberelliinihappoliuoksessa	Idätyspaikka	Mukulamäärä (kpl)
1	Fambo	29.10.2015	pariisinperunaurauta	10	2 min	kasvihuone	64
1	Fambo	5.11.2015	kokonainen	0	2 h	kasvatuskaappi	45
1	Fambo	5.11.2015	kokonainen	10	2 h	kasvatuskaappi	45
1	Fambo	5.11.2015	kokonainen	50	2 h	kasvatuskaappi	45
1	Fambo	5.11.2015	kokonainen	0	2 h	jääkaappi	45
1	Fambo	5.11.2015	kokonainen	10	2 h	jääkaappi	45
1	Fambo	5.11.2015	kokonainen	50	2 h	jääkaappi	45
1	Puikula	29.10.2015	pariisinperunaurauta	10	2 min	kasvihuone	64
1	Puikula	5.11.2015	kokonainen	0	2 h	kasvatuskaappi	45

1	Puikula	5.11.2015	kokonainen	10	2 h	kasvatus- kaappi	45
1	Puikula	5.11.2015	kokonainen	50	2 h	kasvatus- kaappi	45
1	Puikula	5.11.2015	kokonainen	0	2 h	jääkaappi	45
1	Puikula	5.11.2015	kokonainen	10	2 h	jääkaappi	45
1	Puikula	5.11.2015	kokonainen	50	2 h	jääkaappi	45
1	Siikli	5.11.2015	pariisinperuna- rauta	10	2 min	kasvihu- one	64
1	Siikli	5.11.2015	kokonainen	50	2 h	kasvatus- kaappi	64
2	Fambo	11.12.2015	kokonainen	0	2 h	kasvatus- kaappi	50
2	Fambo	11.12.2015	kokonainen	10	2 min	kasvatus- kaappi	50
2	Fambo	11.12.2015	kokonainen	10	2 h	kasvatus- kaappi	50
2	Fambo	11.12.2015	halkaistu	0	2 h	kasvatus- kaappi	50
2	Fambo	11.12.2015	halkaistu	10	2 min	kasvatus- kaappi	50
2	Fambo	11.12.2015	halkaistu	10	2 h	kasvatus- kaappi	50

Kasvihuoneen lämpötila vaihteli 16–22 °C:een ja valaistus oli päällä 17 h/vrk. Kasvatuskaapin lämpötila oli säädetty 18 °C:seen (ensimmäiset noin 4 vrk 23 °C:seen) ja suhteellinen kosteus 80 %:iin. Kasvatuskaapin olosuhteet pysyivät koko ajan hyvin lähellä säädettyjä arvoja. Jääkaappi oli säädetty 8 °C:seen, mutta lämpötila vaihteli 4 °C:n ja 10 °C:n välillä. Suhteellinen kosteus jääkaapissa vaihteli välillä 25–45 %.

4.2 Itämisen ja kasvun seuranta

Mukuloiden itämistä seurattiin vähintään kerran viikossa. Mukuloista seurattiin itäneiden määrä ja virustestauskelpoisten määrää. Itämisen rajana pidettiin 2 mm:n pituista itua ja näytteenkäsittelyn kannalta testauskelpoisten rajana noin 30 mm:n itua. Lisäksi osasta mukulaeristä seurattiin pituus-
kasvua tarkemmin, jolloin mukuloista mitattiin pisimmän idun tai verson pituus. Kasvihuoneessa

idätettyjä mukuloita ei kuitenkaan nostettu mittausta varten pois turvekasvualustastaan, joten havainnointi ja mittaus tehtiin turpeen pinnan yläpuolelle nousseista iduista ja versoista.

Itämisen ja kasvun seurannan tulokset on jaettu kahteen osioon, joista ensimmäinen koskee 29.10.2015 ja 5.11.2015 itämään laitettuja mukulaeriä ja toinen 11.12.2015 itämään laitettuja mukulaeriä. Ensimmäistä ja toista osiota ei voida suoraan verrata keskenään, koska kokeiden aloitusajankohdassa oli yli kuukauden ero ja tällöin mukulat ovat olleet erilaisessa fysiologisessa vaiheessa.

4.2.1 Ensimmäinen idätyskoe

Ensimmäisessä idätyskokeessa seurattiin gibberelliinihappokonsentraation vaikutusta pimeässä itämiseen ja itujen kasvuun kahdessa eri lämpötilassa. Vertailukohteena oli lisäksi mukuloiden idätäminen kasvihuoneessa.

Kaikilla käytetyillä lajikkeilla kasvihuoneeseen laitettut mukulat itivät selkeästi lyhyemmässä ajassa kuin pimeässä olleet mukulat. Ne myös kasvoivat pituutta nopeammin. On kuitenkin huomioitava, että mittaustuloksissa kasvihuonemukuloiden virustestauskelpoisuutena käytettiin samaa pituus-kriteeriä kuin pimeäiduille. Todellisuudessa kasvihuoneella itujen annetaan kasvaa versoiksi niin, että testaukseen saadaan riittävästi myös lehtimateriaalia. Kasvihuoneella olevat Fambo- ja Puikula-versot testattiinkin vajaan neljän viikon ikäisinä ja Siikli-versot kuuden viikon ikäisinä. Siikli-versot olisivat tosin kasvunsa puolesta voitu testata paljon aiemminkin. Neljä viikkoa itäneissä pimeäiduissa puolestaan ei ollut testauskelpoisia lukuun ottamatta muutamaa kasvatuskaapissa kasvanutta 50 mg/l gibberelliinihapolla käsiteltyä Famboa. Tarkasteluajanjaksolla ainoastaan yhden mukulaerän (Fambo 50 mg/l gibberelliinihappokäsittely, idätyspaikka jääkaappi) kaikki mukulat saavuttivat 30 mm testauskelpoisuuden rajan. (Liitteet 2–4.)

Sekä Fambolla että Puikulalla gibberelliinihappo nopeutti itämistä erityisesti pitoisuudella 50 mg/l. Fambolla myös 10 mg/l pitoisuus riitti itämisen nopeuttamiseen vesikäsitelyyn verrattuna. Puikulalla ero ei ollut yhtä selvä. Gibberelliinihappo vaikutti myös pääsääntöisesti pituuskasvua edistävästi. 50 mg/l pitoisuus oli siinäkin selkeästi tehokkaampaa. Puikulan kohdalla pituuskasvussa ei

ollut eroa 10 mg/l gibberelliinihapolla ja vedellä käsiteltyjen mukuloiden välillä. Kahdeksan–yhdeksän viikon kohdalla Fambon pelkällä vedellä käsiteltyjen mukuloiden idut ohittivat pituudessaan gibberelliinihapolla käsiteltyjen mukuloiden idut. (Liitteet 2–3.)

Gibberelliinihappo vaikutti itujen kasvutapaan. Pelkällä vedellä käsitellyt mukulat kasvattivat pääsääntöisesti yhtä (Fambo) tai muutamaa (Puikula) itua. Gibberelliinihappo lisäsi itujen määrää ja haaroitti niitä. Tämä oli nähtävissä erityisesti 50 mg/l pitoisuudella. Toisaalta nämä idut olivat ohuempia kuin vedellä käsiteltyjen mukuloiden idut. Näin korkea gibberelliinihappokonsentraatio myös tummensi ja surkastutti itujen päitä erityisesti Famboilla. (Kuva 5.)



KUVA 5. Kasvatuskaapissa pimeäidätettyjä mukuloita yhdeksän viikon kuluttua itämään laitosta. Tarjottimien vasemmalla puoliskolla ovat Puikulat, oikealla Fambot. Ylimmän tarjottimen mukulat on käsitelty vedellä, keskimmäisen tarjottimen 10 mg/l gibberelliinihapolla ja alimman 50 mg/l gibberelliinihapolla.

Jääkaapissa alemmassa lämpötilassa ja suhteellisessa kosteudessa itäminen oli selvästi hitaampaa kuin kasvatuskaapissa. Tämä nähtiin erityisesti Puikulalla. Testauskelpoisia ituja ei juurikaan saatu. Fambon 50 mg/l gibberelliinihapolla käsitellyt mukulat (kuva 6) olivat kuitenkin poikkeus, koska ne olivat lopulta ainoa ensimmäisten pimeäidätyserien mukulaerä, jonka jokaisen mukulan idut kasvoivat testauskelpoisten mittaan. (Liitteet 2–4.)



KUVA 6. Jääkaapissa kasvaneita Fambon ituja. Mukulat käsitelty 50 mg/l gibberelliinihapolla.

4.2.2 Toinen idätyskoe

Toisessa idätyskokeessa verrattiin mukulan halkaisun vaikutusta itämisnopeuteen erikestoisilla 10 mg/l gibberelliinihappokäsittelyillä. Kaikkien mukulaerien kaikki mukulat olivat itäneet 12 vrk:n kuluessa itämään laitosta lukuun ottamatta erää, joka oli halkaistu ja joka oli käsitelty pelkällä vedellä. Tämänkin erän kaikki mukulat olivat itäneet 26 vrk jälkeen. (Liite 5.)

Halkaisu ja gibberelliinihappo yhdessä nopeuttivat kasvuvauhtia. Sekä 2 minuutin että 2 tunnin gibberelliinihappokäsittelyn saaneet mukulat olivat testausvalmiita jo 12 vuorokauden jälkeen. Pelkällä vedellä käsiteltyjen halkaistujen mukuloiden idut sen sijaan kasvoivat testausvalmiiksi kaikista hitaimmin. Gibberelliinihappokäsittelyn keston ei havaittu vaikuttavan kasvunopeuteen. (Liite 5.) Myös ulkonäöllisesti molempien käsittelyaikojen vaikutus ituihin on samankaltainen. Gibberelliinihapon vaikutuksesta mukulasta kasvoi useita ohuita ituja, ja itujen päät tummuivat. (Kuva 7.)



KUVA 7. Halkaistuja mukuloita 7,5 viikon kuluttua itämään laitosta. Vasemmalla vesikäsitellyt, keskellä 2 min 10 mg/l gibberelliinihapossa käsitellyt ja oikealla 2 h 10 mg/l gibberelliinihapossa käsitellyt mukulat.

Kokonaisena idätettyjen mukuloiden idut kasvoivat testausvalmiiksi huomattavasti hitaammin kuin halkaistut ja gibberelliinihapolla käsitellyt mukulat. Alussa kokonaisina idätetyillä mukuloilla kasvu testausvalmiiksi oli nopeinta niillä, jotka oli käsitelty 2 tunnin ajan gibberelliinihapolla. Pelkällä vedellä käsitellyillä kasvu oli hitainta. Erot kuitenkin tasoittuivat tarkasteluajanjakson loppua kohden. (Liite 4.) Gibberelliinihapon vaikutus itujen kasvutapaan oli samankaltainen kuin halkaistujen mukuloiden tapauksessa. Kokonaisilla mukuloilla idut olivat kuitenkin hieman paksumpia. (Kuva 8.)



KUVA 8. Kokonaisia mukuloita 7,5 viikon kuluttua itämään laitosta. Vasemmalla vesikäsitellyt, keskellä 2 min 10 mg/l gibberelliinihapossa käsitellyt ja oikealla 2 h 10 mg/l gibberelliinihapossa käsitellyt mukulat.

Vaikuttaisi siltä, että gibberelliinihappo pystyy vaikuttamaan paremmin leikkauspinnan kuin perunan kuoren läpi. Halkaistut ja gibberelliinihapolla käsitellyt mukulat tuottivat nopeasti riittävän pitkiä ituja testaukseen. Toisaalta koe aloitettiin vuoden lopulla, jolloin itäminen on muutenkin nopeampaa. Tämä näkyy vertailtaessa ensimmäisen ja toisen idätyskokeen samalla lailla käsiteltyä

Fambo-erää. (Liite 5.) Kuitenkin kokeen sisällä vertailtaessa kasvuvauhti on nopeampaa halkaisuilla ja gibberelliinihapolla käsitellyillä mukuloilla verrattuna kokonaisina käsiteltyihin ja idätettyihin mukuloihin.

4.1 Perunan Y-viruksen testaus idätyskokeiden versoista ja iduista

Kasvihuoneessa kasvaneille versoille ja pimeässä kasvaneille iduille tehtiin DAS-ELISA-testi, jolla testattiin perunan Y-virusta. Tarkoituksena oli selvittää, saadaanko pimeäidusta yhtä luotettavia tuloksia kuin käytössä olevassa menetelmässä, jossa testaukset tehdään versoista, eli siirtykö virusta mukulasta ituun samalla tavalla kuin versoon. Iduista tehty testaus voitaisiin katsoa luotettavaksi menetelmäksi, jos saman perunaerän idut ja versot antaisivat positiivisia tuloksia samassa suhteessa. Aiemmin laboratoriossa tehdyissä kokeissa iduilla on saatu samansuuntaisia tuloksia kuin versoilla. Tätä haluttiin kuitenkin tutkia lisää.

Testaukset tehtiin kaikista idätyseristä lukuun ottamatta jääkaapissa itäneitä mukuloita, joiden iduista vain osa olisi ollut kooltaan testauskelpoisia. Lisäksi kasvatuskaapissa kasvaneista Siikli- iduista testattiin vain 30 kpl. Testaukset tehtiin jokaisen mukulan iduista tai versoista erikseen. Ainoastaan yksi näyte antoi positiivisen tuloksen. Kyseessä oli 11.12.2015 itämään laitettu halkaistu Fambo, jota oli käsitelty 10 mg/l gibberelliinihapolla 2 minuuttia. Kaikkien muiden testattujen mukuloiden versot ja idut olivat negatiivisia perunan Y-virukselle. Itutestauksen luotettavuutta ja gibberelliinihapon vaikutusta perunan Y-virukseen ei siis pystytty arvioimaan, koska positiivisia mukuloita ei ollut tarpeeksi. Viroottisen siemenperunan saanti kokeeseen oli haasteellista, sillä PVY:tä esiintyi vähän kasvukaudella 2015 (12, s. 9).

Lähes kaikkien mukuloiden idut olivat tarpeeksi suuria mehupuristimella käsiteltäviksi. Testauskelpoisuuden 30 mm:n raja onkin lähinnä suuntaa antava puristuksen kannalta. Vedellä käsitellyt mukulat tuottivat pääsääntöisesti yhden ison idun, josta saatiin paljon mehua. Gibberelliinihappokäsitellyillä mukuloilla idut olivat ohuempia, mutta niiden suuri määrä korvasi kokoa.

5 PERUNAN VIRUSTEN TOTEAMISRAJOJEN MÄÄRITYS DAS-ELISA-TESTIIN

Virusten toteamisrajojen määrittämistä varten tarvittiin riittävä määrä puhdasta virusta, joten suunnitelmassa oli ensin tartuttaa viruksia isäntäkasveihin, joissa niiden toivottiin lisääntyvän. Tämän jälkeen virukset eristettäisiin kasveista ja puhdistettaisiin. Virusten pitoisuus määritettäisiin ja voitaisiin tehdä standardisuora DAS-ELISA-testiin.

5.1 Perunan virusten inokulointi eli tartutus isäntäkasveihin

Perunan Y-, A-, X-, S- ja M-viruksia inokuloitiin isäntäkasveina käytettyihin *Nicotiana tabacum*in Samsun-lajikkeeseen ja *Nicotiana benthamiana*an. Isäntäkasveissa oli pääasiassa kahdesta neljään lehtiparia (lukuun ottamatta sirkkalehtiä) ennen inokulaation suorittamista. Inokulointi tehtiin vanhoista positiivista näytteistä, joita oli säilytetty $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 6 vuotta (PVM, PVS, PVY, PVX) tai $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 3 vuotta (PVA, PVY). Näytteet homogenisoitiin 0,1 M tai 0,05 M fosfaattipuskurissa (pH 7,0), minkä jälkeen homogenaattia levitettiin isäntäkasvin alalehteen, johon oli siroteltu carborundum-jauhetta (karkeus F120). Homogenaattia hangattiin kevyesti vanupuikolla lehteä vasten, jolloin lehden pinta vahingoittui. Tämän tarkoituksena oli mahdollistaa virusten pääsy kasvin neste-kiertoon. Inokuloituja kasveja pidettiin aluksi kasvihuoneessa, mutta myöhemmin ne siirrettiin kasvatuskaappiin, jossa kasvun havaittiin olevan nopeampaa

Kolmen viikon kuluttua inokuloinnista kasvien virukset testattiin DAS-ELISA-testillä. Ainoastaan PVX:llä inokuloidut antoivat virukselle positiivisen tuloksen. Näistä PVX:llä inokuloiduista kasveista tehtiin jatkoinokulointi uusiin kasveihin. Muilla viruksilla inokuloidut kasvit testattiin vielä kahden viikon päästä uudelleen, jolloin yksi PVS:llä inokuloitu kasvi antoi positiivisen tuloksen DAS-ELISA-testissä. Tehtiin jatkoinokulointi tästä kasvusta uusiin tupakoihin ja lisäksi päätettiin tehdä jatkoinokulointi myös kasveista, jotka oli inokuloitu PVA:lla, PVM:llä ja PVY:llä, vaikka näissä kasveissa ei DAS-ELISA-testin mukaan ollut kyseisiä viruksia. Näin meneteltiin, koska pakastimessa säilytetyillä näytteillä tehdyn inokuloinnin jälkeen virus voi lisääntyä kasvissa hitaasti, ja näin ollen viruskonentraatio testikasveissa olisi voinut olla alle toteamisrajan (13). PVY:n kohdalla tehtiin tällöin inokulointia myös uudemmassa positiivisesta näytteestä. Tässä vaiheessa *Nicotiana benthamiana*

-kasvien kasvatus lopetettiin, koska ne olivat alkaneet kukkia, jolloin kasvilla saattaa muodostua immuniteetti virusta vastaan.

Tupakoiden kasvatusta jatkettiin virusten puhdistukseen tai kukinnan alkamiseen saakka. Kukkiimaan alkaneiden tupakoiden lehtiä säilytettiin pakastimessa puhdistukseen asti. Ennen puhdistusta kaikista tupakoista tehtiin vielä virustestaus ELISAlla, joka antoi positiivisen tuloksen vain PVX:llä inokuloituille kasveille.

5.2 Virusten puhdistus

Vaikka ennen puhdistusta DAS-ELISA-testissä ei havaittu viruksia muista kasveista kuin PVX:llä inokuloituista, yritettiin virusten puhdistusta PVX:n lisäksi PVY:llä inokuloituista kasveista. PVY:n kohdalla käytettiin Jari Valkosen laatimaa työohjetta PVA:n, PVV:n ja PVY:n puhdistukselle (liite 6), joka perustui kahteen muuhun artikkeliin (14; 15). PVX:n puhdistukselle ei löydetty artikkeleita tai ohjetta, jossa olisi mainittu tarkasti sentrifugointiajat ja -nopeudet, joten puhdistuksessa käytettiin samoja arvoja kuin edellä mainitussa työohjeessa. Puhdistuksen muilta osin käytössä oli ”Properties of resistance-breaking strain of potato virus X” -artikkelissa kuvattu menetelmä (16, s. 94–95).

Selkeänä erona Jari Valkosen työohjeeseen nähden oli se, että käytössä ei ollut ”swinging bucket” -sentrifugiroottoreita, vaan kaikki sentrifugoinnit tehtiin ”fixed angle” -roottoreilla. 8800 g:lle käytettiin Sigma Centrifugesin roottoreita 12150-H ja 19777-H ja muille nopeuksille Beckman Coulterin Type 70 Ti -roottoria. Myös sentrifugiputkien koko oli suurempi kuin ohjeessa ja ohjetta skaalattiin sen mukaisesti.

5.2.1 PVY:n puhdistus

Tupakan lehdet kerättiin virusten puhdistusta edeltävänä päivänä ja säilytettiin jääkaapissa 4 °C:ssa yön yli. Osa tupakoiden lehdistä oli kerätty jo aikaisemmin alkaneen kukinnan takia ja säilytetty pakastimessa. Puhdistukseen otettiin kaikki PVY:lla inokuloidut tupakat, joiden lehtien massa oli 240 g. Viruksen puhdistus aloitettiin homogenisoimalla lehdet 0,2 M fosfaattipuskurissa (pH 8,0), johon oli lisätty 0,15 % 2-merkaptetanolia ja 0,01 M EDTA:ta. Puskuria käytettiin 480 ml. Homogenaatti suodatettiin harsokankaan läpi ja sentrifugoitiin 8800 g:ssa 20 min. Supernatanttiin

lisättiin 1 % Triton X-100:aa ja sekoitettiin 3 h 4 °C:ssa. Virus saostettiin lisäämällä liuokseen polyetyleeniglykoli 6000:ta 40 g/l ja natriumkloridia 0,2 M. Liuoksen sekoittamista jatkettiin 1,5 h.

Saos kerättiin sentrifugoimalla 8800 g:ssa 20 min. Supernatantti poistettiin putkista ja putkiin lisättiin 0,2 M fosfaattipuskuria (pH 8,0). Putkia ravisteltiin yön yli 4 °C:ssa. Liukenematta jäänyt osuus poistettiin sentrifugoimalla kuten aiemmin. Supernatantti sentrifugoitiin 285000 g:ssa 1 h ajan. Supernatantti poistettiin ja putkiin lisättiin samaa fosfaattipuskuria kuin aiemmin ja putkia ravisteltiin yön yli 4 °C:ssa.

Liukenematta jäänyt osuus poistettiin sentrifugoimalla 8800 g:ssa 20 min ajan. Supernatantti siirrettiin putkiin 19 ml sakkaroosiliuoksen päälle (30 %, tehty 0,05 M pH 8 fosfaattipuskuriin). Putkia sentrifugoitiin 90000 g:ssa 3 tuntia. Putkiin kerääntynyt hyvin vähäinen sakka liuotettiin 2 ml:aan 0,05 M fosfaattipuskuria (pH 8,0). Liuokseen lisättiin 2 mg natriumatsidia bakteerikasvun estämiseksi ja liuosta säilytettiin 4 °C:ssa.

Liuosta testattiin heti pikatestillä ja myöhemmin DAS-ELISA-testillä. Kummatkin antoivat negatiivisen tuloksen. Tulos oli odotettavissa, koska myös tupakat, joista puhdistus tehtiin, antoivat DAS-ELISA-testissä negatiivisen tuloksen. Syy inokuloinnin epäonnistumiselle PVY:n, PVA:n, PVM:n ja PVS:n kohdalla oli todennäköisesti se, että inokulointiin käytetyt virusnäytteet ovat päässeet sulamaan, kun niitä on otettu pakkasesta esimerkiksi DAS-ELISA-testausta varten. Pakastus ja sulatus voivat rikkoa viruksen rakenteita mekaanisesti. PVX on edellä mainittuja viruksia kestävämpi, joten se ei ole ilmeisesti kärsinyt samalla tavalla. (17.)

5.2.2 PVX:n puhdistus

Puhdistukseen otettiin lehtiä tupakoista, joista oli määritetty korkeimmat PVX-pitoisuudet. Lehtiä käytettiin 102 g. Lehdet oli pakastettu jo aiemmin -26 °C:ssa. Lehdet homogenisoitiin tehosekoittimessa 0,1 M fosfaattipuskurin (pH 8) kanssa. Fosfaattipuskurissa oli myös 0,02 M 2-merkaptotaetanolia. Puskuria käytettiin 200 ml. Homogenaatti selkeytettiin lisäämällä 20 % (v/v) etanolia ja sentrifugoimalla 8800 g:ssä 20 min. Tässä vaiheessa kasvimateriaali ei ollut pelletoitunut putkien pohjalle hyvin, joten sentrifugointi toistettiin, jotta supernatantti saataisiin hyvin erilleen kasvimateriaalista. Supernatanttiin lisättiin 1 % (v/v) Triton X-100:aa ja 40 g/l polyetyleeniglykolia viruksen saostumiseksi. Liuosta sekoitettiin 30 min huoneenlämmössä. Saos kerättiin sentrifugoimalla 8800

g:ssa 20 min ja liuotettiin 0,1 M fosfaattipuskuriin (pH 7,5). Liukenematta jäänyt osuus poistettiin sentrifugoimalla 8800 g:ssa 20 min. Supernatantti sentrifugoitiin 285000 g:ssa 1 h ajan. Supernatantti poistettiin ja putkeen lisättiin 5 ml 0,1 M fosfaattipuskuria (pH 7,5). Putkea ravisteltiin yön yli 4 °C:ssa. Liukenematta jäänyt saos poistettiin kuten aiemmin.

Supernatantti siirrettiin sentrifugiputkeen 19 ml sakkaroosiliuoksen päälle (30 %, tehty 0,01 M pH 7,5 fosfaattipuskuriin). Putki sentrifugoitiin 90000 g:ssa 3 tuntia. Putkeen kerääntynyt sakka liuotettiin 3 ml:aan 0,01 M fosfaattipuskuria (pH 7,5). Liuokseen lisättiin 3 mg natriumatsidia bakteerikasvun estämiseksi ja liuosta säilytettiin 4 °C:ssa. Saatu liuos testattiin DAS-ELISAlla, joka antoi positiivisen tuloksen.

5.3 Puhdistetun PVX:n pitoisuus ja puhtaus

Puhdistetun PVX:n A_{280}/A_{260} -suhteeksi saatiin 0,800. Ainakin yksi kirjallisuusviite antaa A_{280}/A_{260} -suhteeksi $0,834 \pm 0,002$ (18, s. 417). Puhdistuksen viimeisessä vaiheessa osassa virussakkaa oli hieman tummaa väriä, joten siitäkin voidaan päätellä, että täysin puhdasta virusta ei onnistuttu saamaan. Tarkempi puhtauden määrittäminen olisi vaatinut elektronimikroskoopin käyttöä. Viruksen pitoisuuden määrittämiseen käytettiin virussuspension absorptiota UV-alueella sekä kuoriproteiinin määrään perustuvaa Bradfordin testiä.

5.3.1 Pitoisuuden määrittäminen UV-alueen absorptiolla

PVX:n UV-spektrissä on leveä piikki 260 nm:n kohdalla (18, s. 417). PVX:n absorptiokertoimeksi tällä aallonpituudella on määritetty $2,97 \text{ ml/mg*cm}$ (18, s. 418) ja $2,68 \text{ ml/mg*cm}$ (19, s. 8). Laskussa käytettiin niiden keskiarvoa. Mittaus tehtiin Implen P 360 -nanofotometrillä. Nanofotometrin etuina on, että näytettä tarvitaan vain muutama mikrolitra eikä näytettä yleensä tarvitse laimentaa, joten tulos on tarkempi. Tässäkin tapauksessa näytettä ei laimennettu. Laskettaessa pitoisuutta, pitää ottaa huomioon, mitä nanofotometrin ”hattua” (lid) käytettiin ja käyttää sen kerrointa (lid factor) laskussa. Tässä mittauksessa kertoimena oli 10. Pitoisuus laskettiin kaavasta 1.

$$C_{mg/ml} = \frac{A_{260}}{\epsilon_{ml/mg*cm}} * lid\ factor \quad 1$$

missä

$C_{\text{mg/ml}}$ on viruksen konsentraatio yksikössä mg/ml,

A_{260} absorbanssi aallonpituudella 260 nm ja

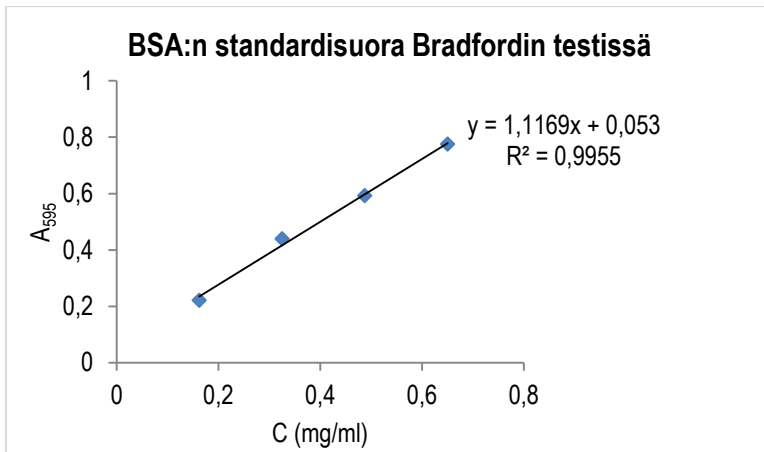
$\epsilon_{\text{ml/mg*cm}}$ absorptiokerroin.

Absorbanssiksi aallonpituudella 260 nm mitattiin 1,223, joten viruksen pitoisuudeksi saatiin 4,33 mg/ml.

5.3.2 Pitoisuuden määrittäminen Bradfordin testillä

Bradfordin testi perustuu väriaine Coomassie Brilliant Blue G-250:n kiinnittymiseen proteiiniin. Väriaineen kiinnittyessä proteiiniin väriaine muuttaa väriään ja sen absorptiomaksimi siirtyy 465 nm:stä 595 nm:iin (20, s. 248). Tämä voidaan mitata spektrofotometrillä. Tässä mittauksessa standardina käytettiin BSA:ta (bovine serum albumin). BSA:n kantaliuos valmistettiin punnitsemalla niin, että pitoisuus olisi 1 mg/ml. Todellinen pitoisuus määritettiin Implen P 360 -nanofotometrin valmiilla BSA:n mittaushjelmalla ja pitoisuudeksi saatiin 0,813 mg/ml.

Bradford-reagenssi valmistettiin liuottamalla 20 mg Coomassie Brilliant Blue G-250:aa 10 ml:aan etanolia ja lisäämällä tähän 20 ml 85-prosenttista fosforihappoa ja laimentamalla 200 ml:n tilavuuteen vedellä. Juuri ennen koetta Bradford-reagenssi suodatettiin kolme kertaa suodatinpaperien läpi sinisen värikomponentin poistamiseksi. BSA:n kantaliuoksesta laimennettiin standardit kertomilla 0,8; 0,6; 0,4 ja 0,2. Puhdistettua PVX:ää laimennettiin laimennoskertoimilla 10 ja 20, joiden oli arvioitu osuvan standardisuoraan. Kantaliuoksen valmistukseen ja kaikkiin laimennoksiin käytettiin PBS-liuosta (pH 7,4). Standardeja ja näytelaimennoksia otettiin mittaukseen 100 μl . Niihin lisättiin 5 ml Bradford-reagenssia ja lisäyksen jälkeen odotettiin 10 min värireaktion tapahtumista. Nämä liuokset siirrettiin kertakäyttökyvetteihin ja mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä aallonpituudella 595 nm. Standardien mittaustuloksen perusteella tehtiin standardisuora (kuva 9).



KUVA 9. BSA:n standardisuora Bradfordin testissä

Standardisuoran perusteella laskettiin pitoisuudet puhdistetun PVX:n laimennoksille ja siitä edelleen puhdistetulle PVX:lle (taulukko 2).

TAULUKKO 2. PVX:n pitoisuus laskettuna standardisuoran perusteella

Näytelaimennos	A ₅₉₅	Laimennoksen pitoisuus (mg/ml)	PVX:n pitoisuus (mg/ml)
10x A	0,347	0,26	2,64
10x B	0,349	0,27	2,66
20x A	0,172	0,11	2,16
20x B	0,174	0,11	2,19
keskiarvo			2,41

Näytelaimennoksista 20-kertainen laimennos ei osunut standardisuoralle. Koska Bradfordin testi mittaa proteiinia, tarvitaan viruspitoisuuden laskemiseen tietoa viruksen koostumuksesta. PVX:n RNA:n osuudeksi virushiukkasen massasta on laskettu noin 6 % ja vastaavasti kuoriproteiinin osuudeksi noin 94 % (21). Kun käytetään standardisuoralle osuneiden näytelaimennosten keskiarvoa, saadaan laskennalliseksi viruspitoisuudeksi 2,82 mg/ml.

Bradfordin testistä saatu viruksen pitoisuus oli 65 % UV-absorbanssin avulla saadusta pitoisuudesta. Bradfordin testin ongelmana tässä mittauksessa oli se, että eri proteiinit antavat erilaisia mittaustuloksia (20, s. 250–251). Standardina käytetty BSA on aminohappokoostumukseltaan erilaista kuin PVX:n kuoriproteiini. Ideaalitulanteessa sekä standardien proteiini että mitattava proteiini olisivat samoja.

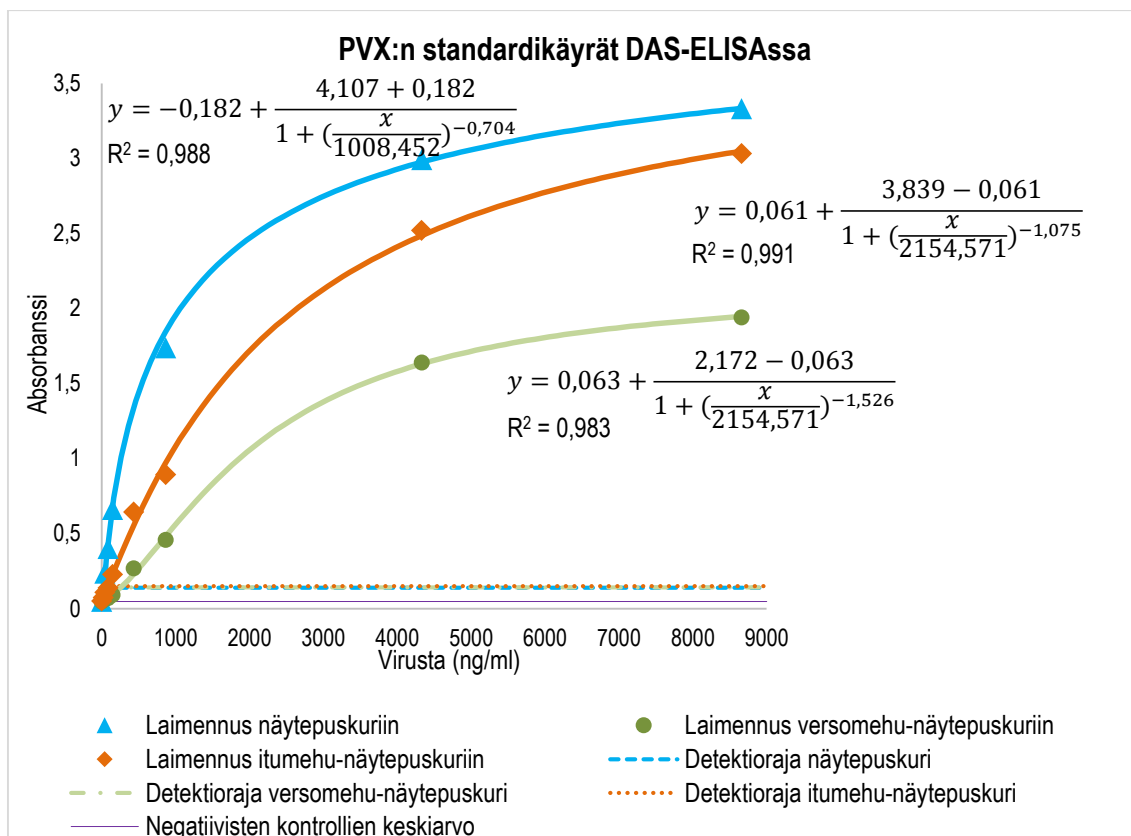
5.4 PVX:n toteamisrajan määrittäminen DAS-ELISA-testissä

Toteamisrajan määrittäminen PVX:lle alkoi laimennustestauksilla. Laimennustestauksilla etsittiin sopivia laimennuskertoimia puhdistetulle PVX:lle. Näytelaimennoksia tehtiin näytepuskuriin, versomehu-näytepuskuriin (suhteessa 1 osa versomehua, 2 osaa puskuria) ja itumehu-näytepuskuriin (suhteessa 1 osa itumehua, 2 osaa puskuria). Kun sopiva laimennusalue oli löydetty, tehtiin standardisarja (taulukko 3). Viruksen pitoisuudeksi käytettiin UV-absorbtiomittauksesta saatua arvoa 4,33 mg/ml). Standardeista tehtiin kaksi rinnakkaista. Levyn ulkoreunan kaivoja ei käytetty mahdollisen reunaefektin vuoksi. Eri mittausajankohdista valittiin mittaus 180 min jälkeen substraatin lisäämisestä, koska siinä standardien absorbanssit olivat korkeimmillaan ennen saturoitumista. Toisin sanoen myöhemmissä mittauksissa kaksi vahvinta standardia saivat samoja, lähes 3,5 absorbanssiarvoja.

TAULUKKO 3. Puhdistetun PVX:n laimennokset DAS-ELISA-testauksen standardisuoraa varten

Laimennoskerroin	Virusta (ng/ml)
500	8660
1000	4330
5000	866
10000	433
30000	144
50000	87
100000	43
200000	22
ei virusta (neg. kontrolli)	0

Mittaustuloksista havaittiin, että DAS-ELISA-testi PVX:lle on melko lineaarinen pienillä pitoisuuksilla, mutta kokonaisuudessaan lineaarinen regressio ei ole hyvä kuvaamaan pitoisuuden ja absorbanssin suhdetta. Standardikäyrien muodostamiseen käytettiin neljän parametrin logistista regressioanalyysia (kuva 10). Käyrien yhtälöt laskettiin ELISA-testiä varten tarkoitetulla ohjelmalla (22).



KUVA 10. PVX:n standardikäyrät DAS-ELISA-testauksessa. Eri negatiivisten kontrollien absorbanssit ovat niin lähellä toisiaan, että selkeyden vuoksi kuvioon on merkattu vain niiden keskiarvo.

Toteamisrajojen absorbanssiarvoiksi käytettiin negatiivisten kontrollien rinnakkaisten keskiarvoa, joka kerrottiin kolmella. Toteamisraja viruksen määränä laskettiin sijoittamalla nämä arvot käyrien yhtälöihin. (Taulukko 4.)

TAULUKKO 4. Toteamisrajat PVX:lle

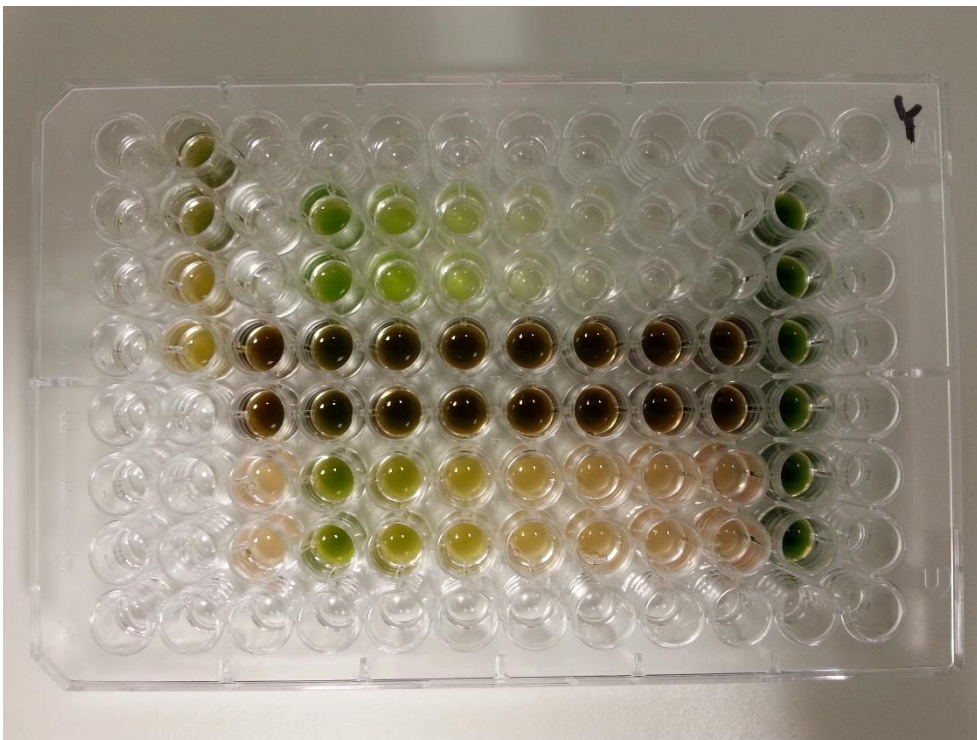
Negatiivinen kontrolli	Neg. kontrollien rinnakkaisten keskiarvo	Toteamisraja (absorbanssi)	Toteamisraja (ng/ml virusta)
Näytepuskuri	0,0467	0,1401	28
Versomehu-näytepuskuri	0,0475	0,1425	258
Itumehu-näytepuskuri	0,0505	0,1515	80

Mittaustulosten perusteella PVX:n toteamisraja vaihtelee sen mukaan, mihin PVX on laimennettu. Versomehu inhiboi voimakkaimmin PVX:n toteamista tässä mittauksessa. Tämä voi selittyä kasvi-materiaalin sisältämällä entsyymeillä tai muilla aineilla, jotka tuhoavat virusta. Itumehun aiheuttama inhibitio ei ollut niin voimakas kuin versomehun. Koska rinnakkaisia standardeja oli vain kaksi eikä

useampia testejä ehditty enää tehdä, ovat saadut toteamisrajat lähinnä suuntaa antavia, mutta suuruusluokka lienee oikea.

5.5 Laimennustestaukset PVY-näytteestä

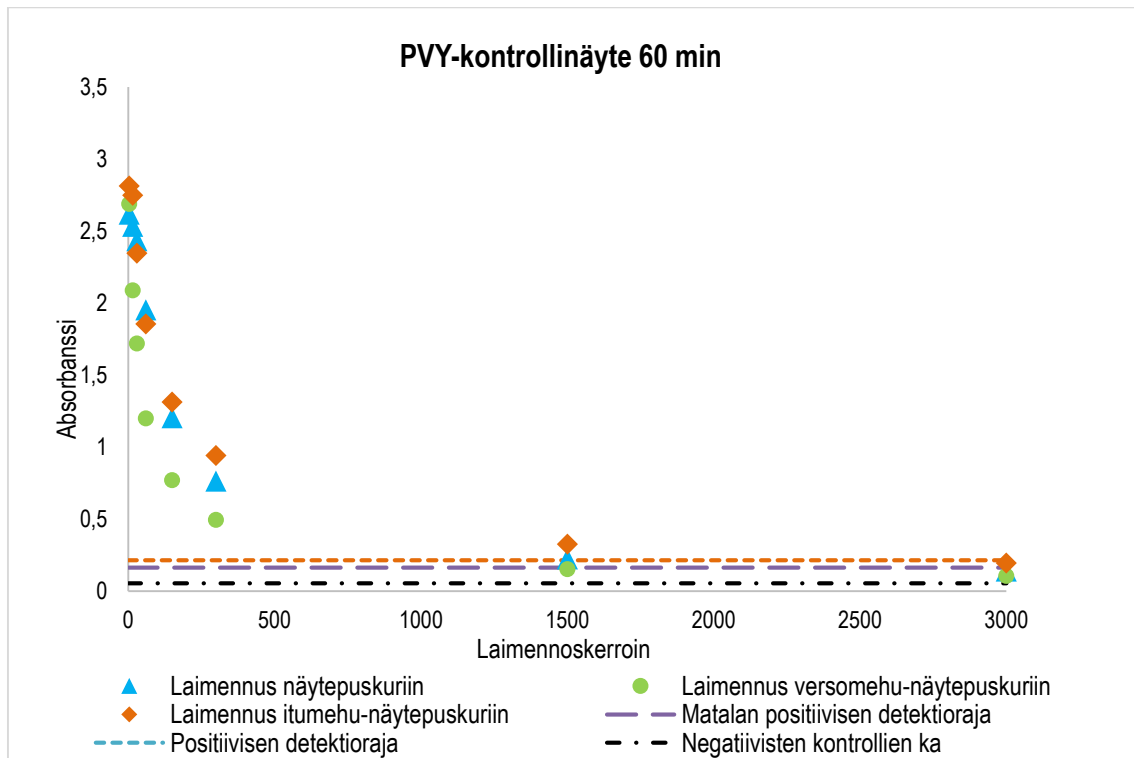
Laimennustestauksen tarkoituksena oli kokeilla, kuinka paljon positiivista näytettä voidaan laimentaa niin, että se vielä saa DAS-ELISalla testattaessa positiivisen tuloksen. Tavoitteena oli myös verrata itumehun antamaa taustaa versomehuun. Tuoreesta kasvamassa olleesta PVY-positiivisesta kontrollinäytteestä (peruna, lajike ei tiedossa) otettiin versoja, joista puristettiin mehua näytepuskuriin (1 osa näytettä, 2 osaa näytepuskuriä) (laimennuskerroin 3). Tästä liuksesta tehtiin laimennussarja näytepuskuriin, PVY-negatiiviseen versomehu-näytepuskuriin ja itumehu-näytepuskuriin vastaavalla tavalla kuin PVX:n toteamisrajan määrittämisessä. Laimennuskertoimina olivat 3, 15, 30, 60, 150, 300, 1500 ja 3000. Tästä jatkettiin pipetoimalla laimennokset (kahdet rinnakkaiset) kuoppalevyille (kuva 11) ja jatkamalla aiemmin kerrotulla tavalla.



KUVA 11. PVY:n näytelaimennoksia kuoppalevyllä

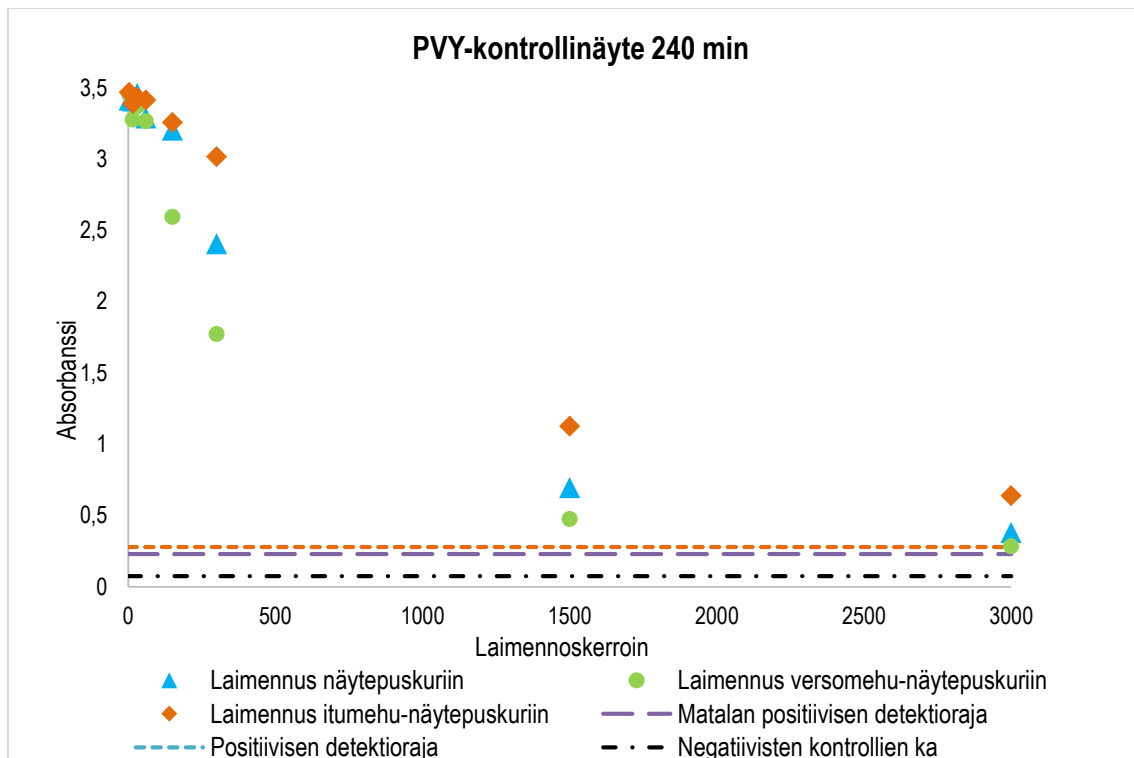
PVY:llä mittaus tehdään yleensä 30 min ja 60 min kuluttua substraatin lisäämisestä. Tässä koeksessa 60 min kohdalla näytepuskuriin ja itumehu-näytepuskuriin tehdyt laimennokset kertoimella

1500 antoivat positiivisen tuloksen. Laimennoskertoimella 3000 näytteet eivät olleet laskennallisesti positiivisia, mutta erottuivat taustasta (negatiivisista kontrolleista). (Kuva 12.)



KUVA 12. PVY-kontrollinäytteen laimennuskuvaaja 60 min kuluttua substraatin lisäämisestä

Mittauksia jatkettiin kunnes oli kulunut 240 min substraatin lisäämisestä. Tässä vaiheessa kaikkiin eri liuoksiin tehdyt laimennokset saivat positiivisen tuloksen laimennoskertoimella 3000 (kuva 13). Myös negatiiviset kontrollit ja pelkkä näytepuskuri saivat selvästi suurempia absorbansseja kuin 60 minuutin kohdalla, joten epäspesifistä reaktiota alkoi tapahtua (liite 8). Voi kuitenkin olla, että 60 minuuttia ei aina riitä hyvin pienten virusmäärien toteamiseen. Toisaalta siinäkin mittausajassa absorbanssit olivat selvästi koholla negatiivisiin kontrolleihin verrattuna, ja laboratoriossa jokaisella testauskerralla sopiva mittausaika määritellään huomioiden sekä epäspesifiset reaktiot että spesifisten reaktioiden voimakkuus ja kehittymisnopeus.



KUVA 13. PVY-kontrollinäytteen laimennuskuvaaja 240 min kuluttua substraatin lisäyksestä

Näytteenä käytetty perunan verso antoi paljon korkeammat absorbanssiarvot kuin vanhemmat positiiviset kontrollit, joita käytettiin tässä työssä. Näytteen viruspitoisuus saattaa siis olla poikkeuksellisenkin korkea, joten tulokset eivät ole yleistettävissä. Kuitenkin laboratorion käyttämä näytemehun (1 osa) ja näytepuskurin (2 osaa) suhde on melko varovainen, ja näytepuskuria osuutta voitaisiin ehkä kasvattaa. Riskinä on kuitenkin, että silloin hyvin pienet pitoisuudet saattaisivat jäädä havaitsematta.

Tässä kokeessa versomehu inhiboi virusta samoin kuin PVX:n toteamisrajoja määritettäessä. Itumehulla ei ollut samanlaista vaikutusta, vaan pikemminkin päinvastoin. Mittaustuloksista havaittiin kuitenkin, että itumehu-näytepuskuri itsessäänkin antaa suuremman absorbtion kuin pelkkä näytepuskuri tai versomehu-näytepuskuri (liite 8). Syynä voi olla myös yksinkertaisesti pipetointivirhe. Valitettavasti aika ei riittänyt tekemään enempää testauksia.

6 UUDEN MONILEIMALUKIJAN KÄYTTÖÖNOTTO

Opinnäytetyöhön kuului BMG Labtech FLUOstar Omega -monileimalukijan käyttöönotto laboratorion perunavirusnäytteitä varten. Käyttöönotossa verrattiin, että laitteen antamat tulokset ovat yhtenäiset aiemmin käytössä olleeseen levylukijaan verrattuna ja määritettiin laitteen tulostenkäsittelyohjelma laskemaan tulokset näytteille automaattisesti. Lisäksi tehtiin käyttöohjeet laitteella mittaamiseen ja tulostenkäsittelyohjelman käyttämiseen (liite 9). Varsinaista validointia lukijalle ei ehditty tehdä.

Työn aluksi monileimalukija antoi välillä korkeita absorbanssiarvoja kuoppalevyn kaivoille, joille vanhempi levylukija antoi alhaisia absorbanssiarvoja. Silmämääräisesti katsottuna nämä kaivot olivat värittömiä, jolloin absorbanssin aallonpituudella 405 nm pitäisi olla alhainen. Toistettaessa mitausta monileimalukija antoi odotetunlaisen alhaisen absorbanssiarvon. Tätä ongelmaa oli kaikilla, jotka tekivät DAS-ELISA-testin mittauksia laboratoriossa, ja tästä ongelmasta oltiin myös yhteydessä laitteen maahantuojaan. Ongelmaan ei löydetty selitystä tai ratkaisua, mutta ongelma loppui myöhemmin opinnäytetyön edetessä eikä siihen siksi palattu. Muita ongelmia laitteessa ei havaittu.

Laitteen tulostenkäsittelyohjelmaan tehtiin laskukaavat (template) perunan virusten mittaustuloksia varten. Laitteen käyttöohjeesta ei ollut apua tässä, koska siinä ei juurikaan käsitelty laskukaavojen luontia. Tutustumalla tarpeeksi tulostenkäsittelyohjelmaan haluttujen laskukaavojen luonti kuitenkin onnistui.

7 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli verrata kasvihuoneessa kasvatettuja perunan versoja pimeässä idätettyihin perunan ituihin ELISA-virustestausmenetelmän kannalta, perunan virusten toteamisrajojen määrittäminen ELISAssa ja sopivan näytelaimennosalueen tutkiminen. Lisäksi tavoitteena oli ottaa käyttöön laboratorion uusi monileimalukija ja koota yhteen aikaisempia perunan virus- ja bakteerianalyysien tuloksia.

Nykyisin käytössä oleva menetelmä, toisin sanoen perunan mukuloiden idätys ja kasvatustapa kasvihuoneessa vaikuttaisi tulosten perusteella olevan nopein keino saada tarvittavaa näytemateriaalia DAS-ELISAssa. Pimeäidätys on huomattavasti hitaampi tapa. Mukuloiden halkaisulla ja sen jälkeisellä gibberelliinihappokäsittelyllä voitaisiin mahdollisesti nopeuttaa pimeäidätystä. Kunnollista vertailua ei pystytty kuitenkaan tekemään, koska halkaistut mukulat laitettiin itämään huomattavasti myöhemmin kuin kasvihuoneeseen viedyt mukulat. Eri kokeissa käytetyt mukulat olivat siis erilaisessa lepotilassa, mikä vaikuttaa niiden itämisnopeuteen. Gibberelliinihappokäsittely joudutti mukuloiden itämistä ja itujen kasvua alkuvaiheessa, mutta myöhemmässä vaiheessa pelkällä vedellä käsiteltyjen mukuloiden idut ottivat ne kiinni. Gibberelliinihappo myös vahingoitti ituja erityisesti korkeammilla pitoisuuksilla.

Itutestauksen luotettavuuden tutkiminen ei onnistunut, koska käytetyt mukulat olivat puhtaita perunan Y-viruksesta. Käytännön työn kannalta itujen käsittely testauksessa onnistui hyvin, vaikkakin versojen puristaminen mehuksi oli pääsääntöisesti nopeampaa.

PVX:n toteamisrajan määrittäminen onnistui. Havaittiin, että kasvimateriaali vaikuttaa DAS-ELISAssa viruksen toteamista inhiboivasti. Muiden virusten kohdalla toteamisrajojen määrittäminen epäonnistui heti alussa, koska isäntäkasvin tartutukseen käytetyt virusnäytteet eivät olleet enää tartutuskykyisiä. Myös PVY:n laimennoskokeessa huomattiin versomateriaalin inhiboiva vaikutus virustestaukseen. Laimennoskokeessa selvisi myös, että ainakin joitakin näytteitä voidaan laimentaa yli tuhatkertaisestikin niin, että virus voidaan vielä todeta.

Aiemmat virus- ja bakteerianalyysitulokset saatiin koottua muun työn ohessa suunnitellusti. Uuden monileimalukijan käyttöönotossa oli aluksi haasteensa, mutta vika vaikutti korjaantuneen itsestään, toivottavasti lopullisesti.

Opinnäytetyössä oli monta osa-aluetta, joihin olisin paneutunut mielelläni lisää. PVX:n toteamisrajojen määrittäminen olisi kaivannut lisää toistoja samoin kuin PVY:n laimennuskokeet. Monileimalukijan toistettavuutta ja muita parametreja olisi voitu tarkastella. Aika tuli kuitenkin vastaan.

LÄHTEET

1. Valkonen, Jari 2007. Viruses: Economical Losses and Biotechnological Potential. Teoksessa Vreugdenhil, Dick – Bradshaw, John – Gebhardt, Christiane – Govers, Francine – MacKerron, Donald K. L. – Taylor, Mark A. – Ross, Heather A. (toim.). Potato Biology and Biotechnology. Amsterdam: Elsevier Ltd. S. 619–641.
2. Ahvenniemi, Paavo – Hannukkala, Asko – Valkonen, Jari 2012. Kasvitaudit. Teoksessa Ahvenniemi, Paavo (toim.). Ajankohtaisia kasvinsuojeluohjeita. Kasvinsuojeluseura ry:n julkaisuja n:o 103. 15., uudistettu painos. Hämeenlinna: Kariston Kirjapaino Oy. S. 143–167.
3. Sertifioidun siemenperunan tuotanto ja tarkastukset – Eviran ohje 13003/3. 2015. Evira. Saatavissa: http://www.evira.fi/files/attachments/fi/kasvit/siemenet/ohjeet/eviran_ohje_13003_3.pdf. Hakupäivä 4.4.2016.
4. Bremer, Katri – Valkonen, Jari – Tapio, Eeva 2005. Kasvi sairastaa – oppi kasvitaudeista. 3. painos. Helsinki: Yliopistopaino.
5. Dolja, Valerian V. – Gergerich, Rose C. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. Saatavissa: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogen-groups/pages/plantviruses.aspx>. Hakupäivä: 5.4.2016.
6. Milne, Robert G. 1988. Taxonomy of the Rod-Shaped Filamentous Viruses. Teoksessa Milne, Robert G. (toim.). The Plant Viruses Volume 4 The Filamentous Plant Viruses. New York: Plenum Press. S. 3–50.
7. Hiltunen, Lea – Kirchner, Sascha – Valkonen, Jari – Virtanen, Elina 2010. Y-viruskierteen katkaisemisen H-hetki käsillä. Tuottava peruna vol. 37, nro 2. S. 16–19.
8. Potato Virus Y Leaf 2.jpg 2010. Saatavissa: http://gardener.wikia.com/wiki/File:Potato_Virus_Y_Leaf_2.jpg. Hakupäivä: 11.3.2016.
9. Bartlett, Ann – Bidwell, D. E. – Voller, A. 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bulletin of the World Health Organization vol. 53, nro 1. S. 55–65. Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2366417/pdf/bullwho00458-0061.pdf>. Hakupäivä: 9.3.2016.
10. Jackson, Lynn R. – Lipman, Neil S. – Trudel, Laura J. – Weis-Garcia, Frances 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. ILAR Journal vol. 46, nro 3. S. 258–268.
11. Lajikkeet. Suomen siemenperunakeskus Oy. Saatavissa: <http://www.spk.fi/lajikkeet/lajikkeet>. Hakupäivä 13.3.2016.

12. Korttemaa, Hanna – Ranta, Hanna 2016. Siemenperunatilanne vakaa – Laboratoriotestaus muuttui. Tuottava peruna vol. 43, nro 1. S. 7–11.
13. Valkonen, Jari 2015. Suullinen tiedonanto. 26.10.2015.
14. Fribourg, C. E. – Nakashima, J. 1984. Characterization of a New Potyvirus from Potato. Phytopathology vol. 74, nro 11. S. 1363–1369. Saatavissa: http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1984Articles/Phyto74n11_1363.pdf. Hakupäivä: 1.3.2016.
15. Browning, I. A. – Burns, R. Darling, M. – George, E. L. –1995. Development and evaluation of DAS-ELISA assays incorporating monoclonal antibodies for the detection of potato A potyvirus. EPPO Bulletin vol. 25, nro 1–2. S. 259–268.
16. Fribourg, C. E. – Jones, R. A. C. – Moreira, A. 1980. Properties of a resistance-breaking strain of potato virus X. Annals of Applied Biology vol. 95, nro 1. S. 93–103.
17. Valkonen, Jari 2016. VS: Perunan virusten inokulointi / opinnäytetyön lähdepyyntö. Sähköpositiivisesti. Vastaanottaja: Miro Saarela. 28.3.2016.
18. Paul, H. L. 1959. Spektralphotometrische Untersuchungen am Kartoffel-X-Virus. Archiv für Mikrobiologie vol. 32, nro 4. S. 416–422.
19. Reichmann, M. E. 1959. Potato X Virus: Part II. Preparation and properties of purified, non-aggregated virus from tobacco. Canadian Journal of Chemistry vol 37, nro 1. S. 4–10. Saatavissa: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/v59-002>. Hakupäivä: 5.4.2016.
20. Bradford, Marion M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry vol. 72, nro 1–2. S. 248–254. Saatavissa: http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf. Hakupäivä: 5.4.2016.
21. Koenig, Renate – Lesemann, D.-E. 1989. Potato virus X. Descriptions of Plant Viruses. Saatavissa: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=354>. Hakupäivä: 5.4.2016.
22. ELISA Analysis – Free ELISA Software, ELISA Curve Fitting, ELISA Data Analysis Software, 4PL Curve Fitting, ELISA Calculator 2012. ELISAKit.com Pty Ltd. Saatavissa: <http://elisaanalysis.com>. Hakupäivä 7.4.2016.

LIITTEET

Liite 1 DAS-ELISA-liuokset

Liite 2 Ensimmäisen idätyskokeen Fambon mittaustulokset

Liite 3 Ensimmäisen idätyskokeen Puikula mittaustulokset

Liite 4 Ensimmäisen idätyskokeen Siiklin mittaustulokset

Liite 5 Toisen idätyskokeen mittaustulokset

Liite 6 PVY:n puhdistusohje

Liite 7 PVX:n standardisuoran absorbanssit

Liite 8 PVY:n laimennuskokeen tulokset

Liite 9 FLUOstar Omegalle laadittu käyttöohje

DAS-ELISA-LIUOKSET

LIITE 1

Kaikkien liuosten laimentamiseen käytetään ultrapuhdasta vettä.

Kouttauspuskuri pH 9,6

0,16 g Na_2CO_3

0,29 g NaHCO_3

Laimennetaan 100 ml:ksi

Näytepuskuri

0,2 g BSA

2,0 g PVP-40

Laimennetaan 100 ml:ksi

Substraattipuskuri pH 9,8

9,7 ml dietanoliamiini

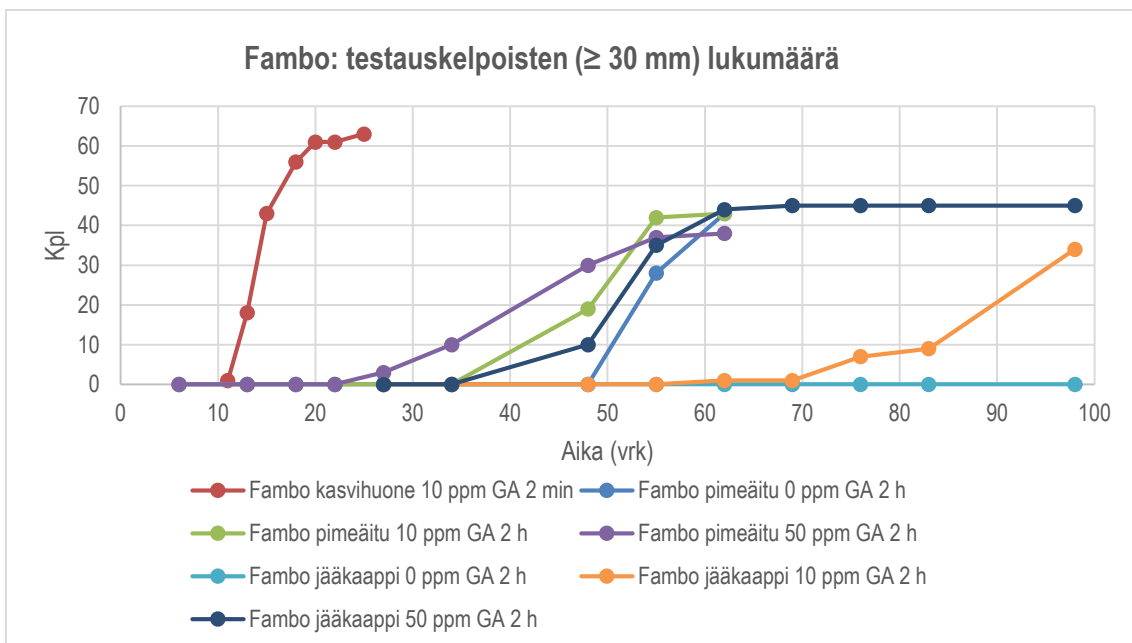
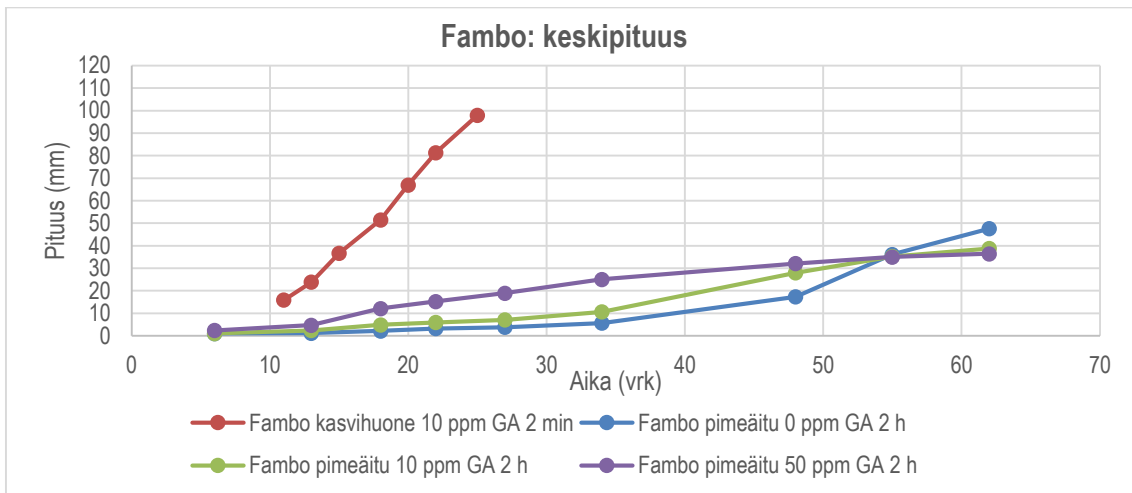
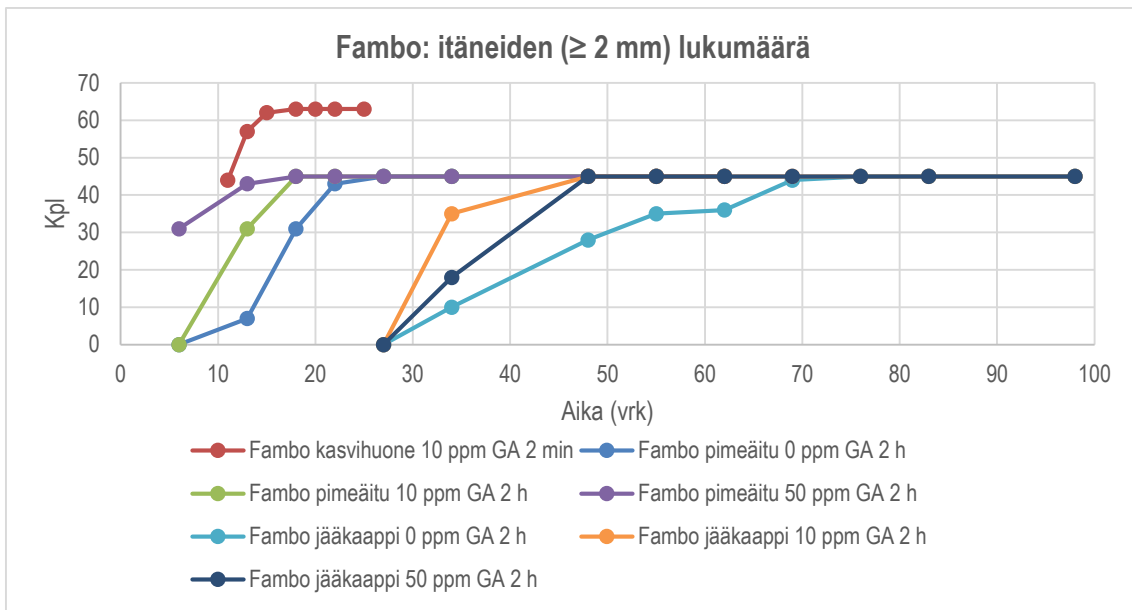
Laimennetaan 100 ml:ksi

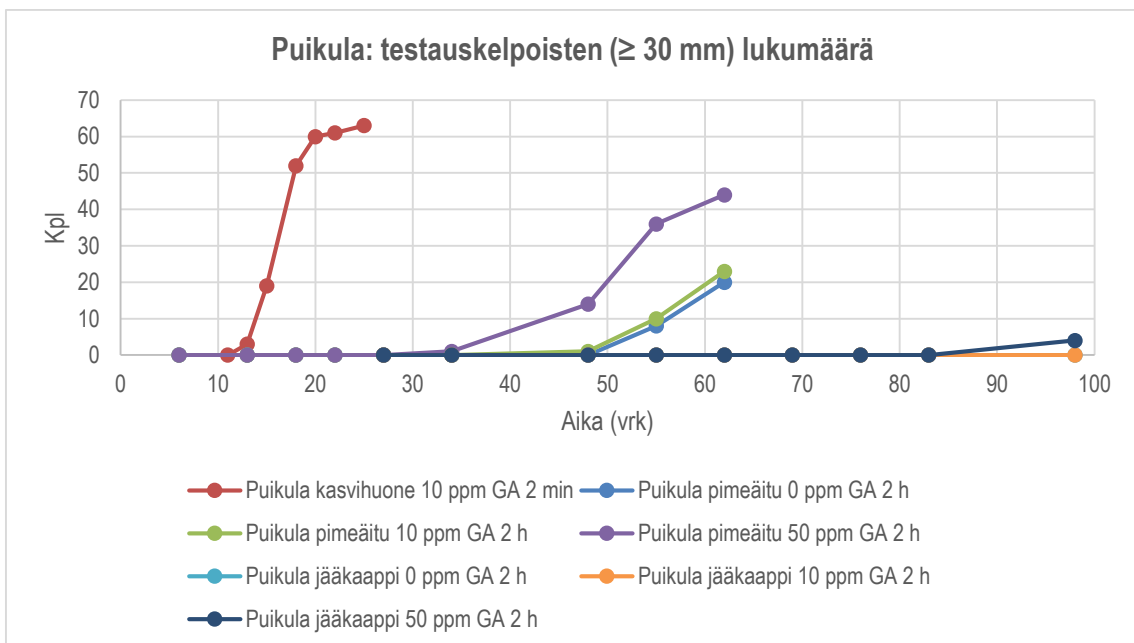
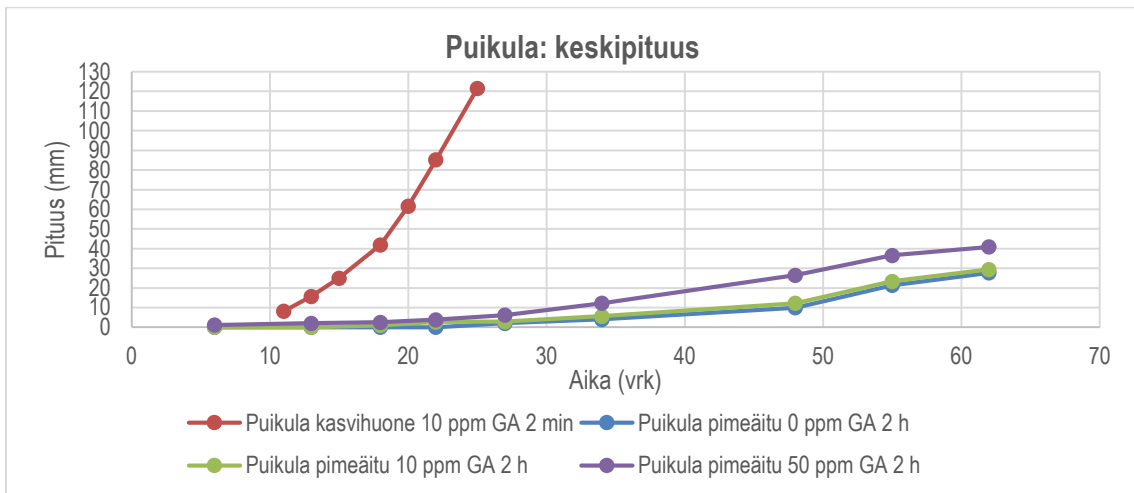
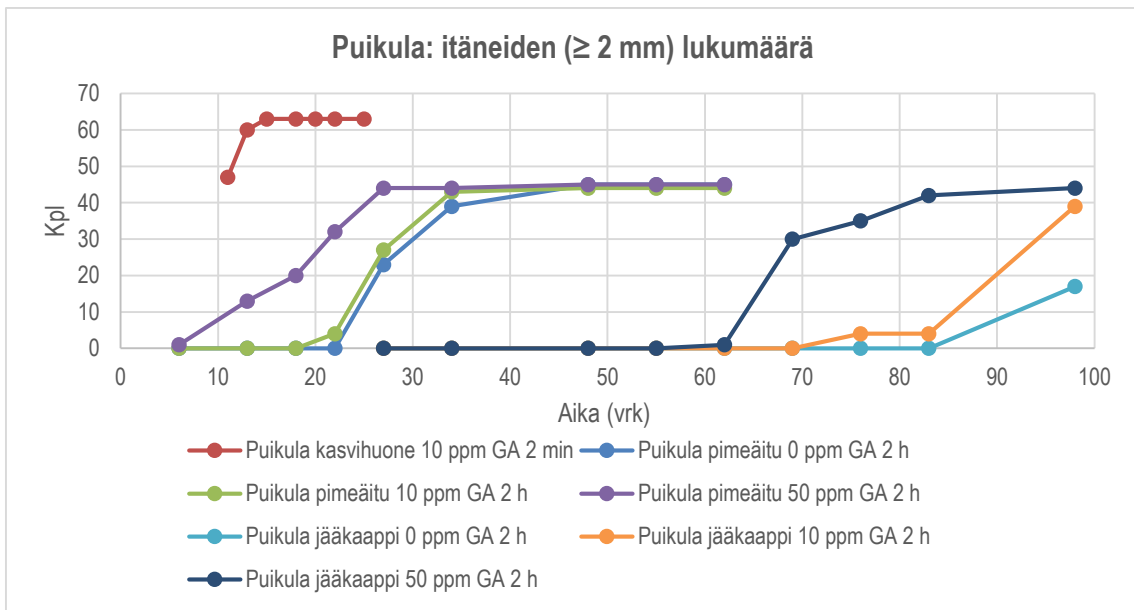
Substraattiliuos

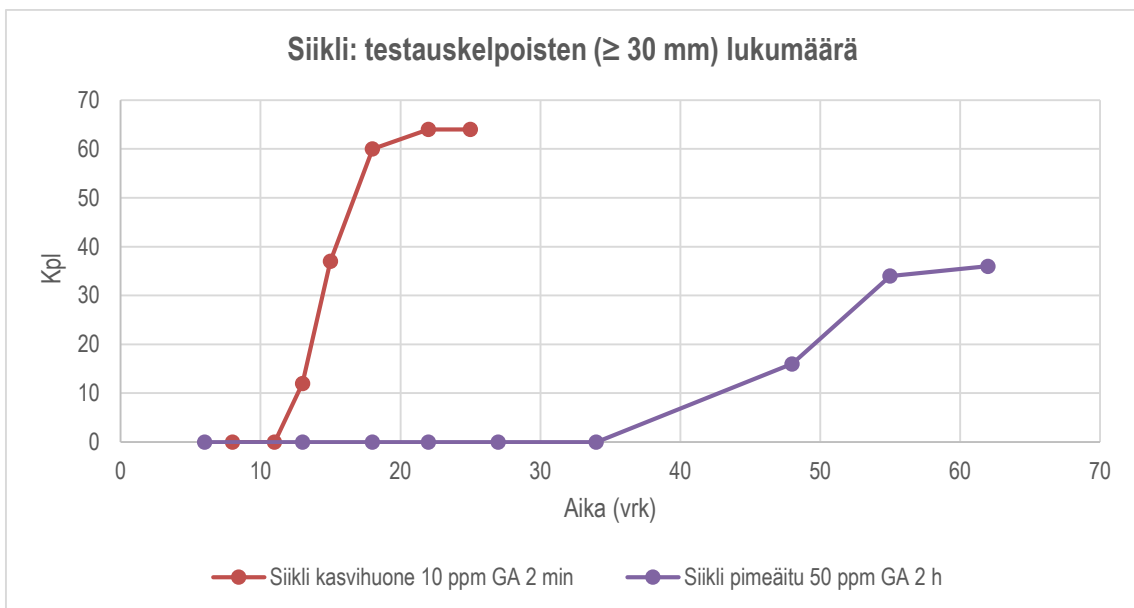
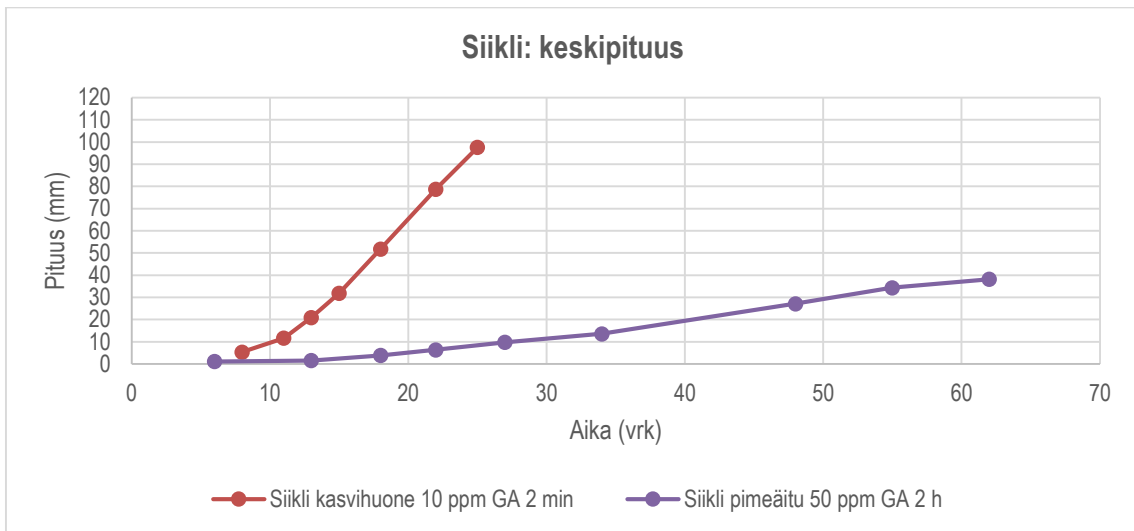
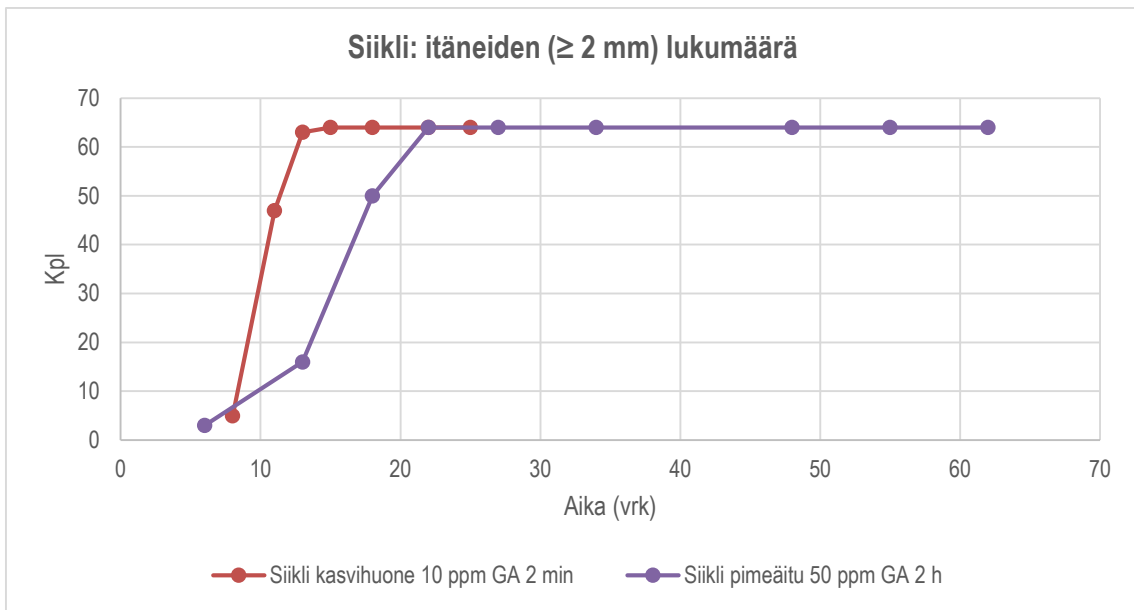
5 mg tabletti paranitrofenyylifosfaattia

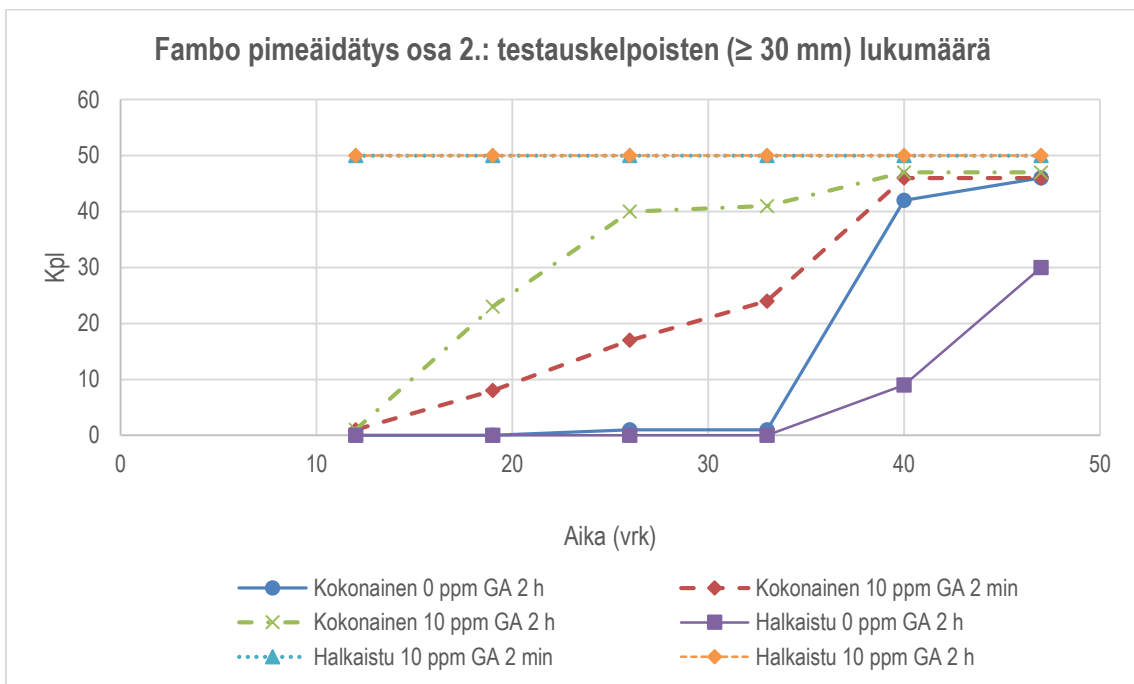
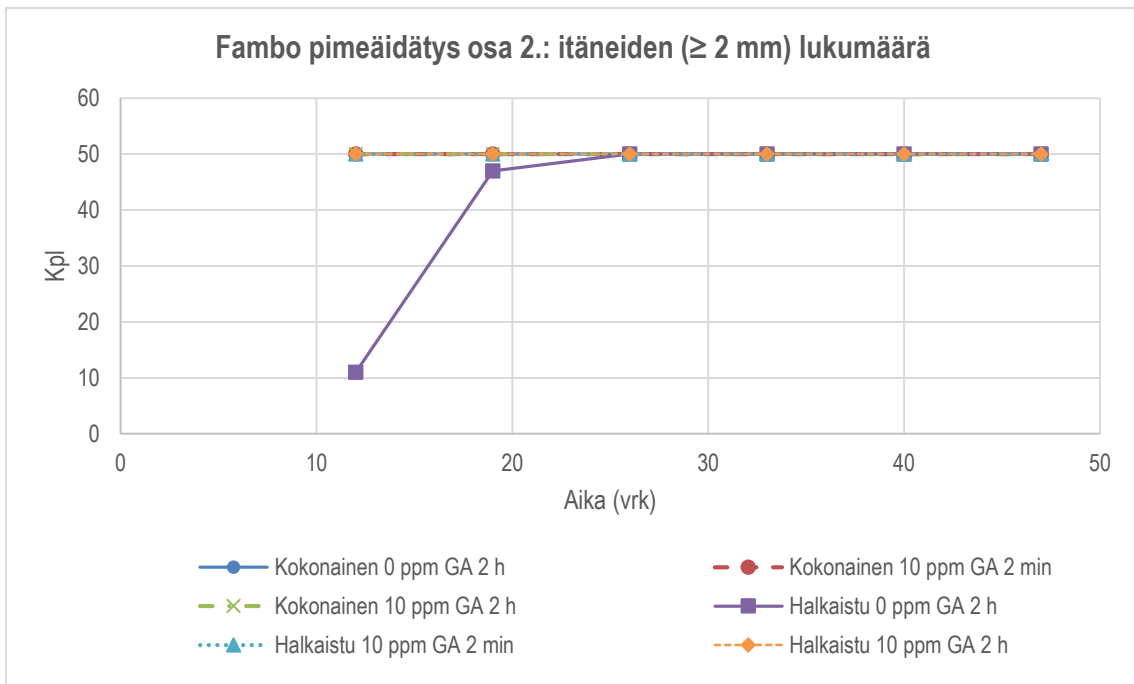
8 ml substraattipuskuria

Vasta-aineet: Neogen PVY, PVA, PVM, PVS, PVX MAb









Purification of PVA and PVV or PVY

Jari V. 8.10.96

Based on:

- Fribourg & Nakashima 1984. Phytopathology 74:1363-1369.
- Browning et al. 1995. EPPO Bulletin 25:259-268.

1. Collect infected leaves and store overnight at 4°C.
2. Homogenize leaves in a Waring blender with 0.2 M phosphate buffer (pH 8) containing 0.15% 2-mercaptoethanol and 0.01 M EDTA (1 g of leaves per 2 ml of buffer).
 → through cheesecloth (pre-washed) → n. 8 800 g
3. Low speed centrifugation (LSC) at 8 000 rpm (J-17 rotor of Beckman J2-21 centrifuge) or 10 000 rpm (No. 30 or 40 rotor of Beckman L2 65B) for 15-20 min.
4. Stir supernatant with 1% Triton X-100 at 4°C for 3 h.
5. Precipitation of the virus: add PEG (polyethylene glycol 6000) 40 g / litre, and add NaCl to make 0.2 M. Stir for 1.5 h.
6. Pellet the precipitate by LSC as above.
7. Resuspend pellet by shaking with 0.2 M phosphate buffer (pH 8) containing 1% Triton X-100 (buffer volume 1/10 of the original volume of supernatant) overnight at 4°C.
8. Pellet insoluble material by LSC.
 method: No 314059
 Beckman SW 50.1
 (50 000 rpm 1 h)
 25 000 rpm 1 h 20 min
 → 2.8500 g
 ultra-16
9. High speed centrifugation (40 000 rpm for 1 h) of the supernatant (No. 65 rotor of Beckman L2 65B).
 → 2.8500 g
10. Resuspend the pellets in 0.2 M phosphate buffer (pH 8) overnight. Some may not become dissolved → remove by LSC.
 Note: If the original amount of leaf material was 120 g, the total amount of buffer used here for resuspension should be 6 ml.
11. Layer the virus suspension (2 ml) on 5 ml of 30% sucrose (in 0.05 M phosphate buffer). Pellet the virus by high speed centrifugation (90 000 g for 3 h).
 → Beckman SW 50.1
 30 000 rpm 3 h
12. Resuspend pellets in 2 ml 0.05 M phosphate buffer (pH 8).
 → as long as needed (add sodium azide to prevent bacterial growth) 2000 mg/ml
 PVA: resuspend to 1 ml → (2000 mg/ml)

Laimen- noskerroin	Virusta (ng/ml)	Laimennokseen käytetty liuos								
		EB			Versomehu-EB			Itumehu-EB		
		A	B	ka	A	B	ka	A	B	ka
500	8660	3,469	3,194	3,332	1,91	1,972	1,941	3,063	3	3,032
1000	4330	3,244	2,742	2,993	1,377	1,905	1,641	2,465	2,574	2,52
5000	866	1,685	1,792	1,739	0,469	0,448	0,459	0,832	0,955	0,894
10000	433	1,448	1,544	1,496	0,283	0,254	0,269	0,631	0,659	0,645
30000	144	0,67	0,651	0,661	0,095	0,091	0,093	0,242	0,216	0,229
50000	87	0,424	0,377	0,401	0,065	0,075	0,07	0,135	0,143	0,139
100000	43	0,218	0,258	0,238	0,066	0,073	0,07	0,101	0,119	0,11
200000	22	0,126	0,116	0,121	0,058	0,058	0,058	0,073	0,076	0,075
ei virusta	0	0,046	0,052	0,049	0,047	0,048	0,048	0,049	0,052	0,051

PVY:N LAIMENNUSKOKEEN TULOKSET

LIITE 8

Laimennoskertoimet

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	P										
B	B	P	0	15	30	60	150	300	1500	3000	1	
C	B	N	0	15	30	60	150	300	1500	3000	1	
D	B	N	0	15	30	60	150	300	1500	3000	1	
E	B		0	15	30	60	150	300	1500	3000	1	
F	B		0	15	30	60	150	300	1500	3000	1	
G	B		0	15	30	60	150	300	1500	3000	1	
H	B											

Laimennus EB:hen

Laimennus versomehu-EB:hen

Laimennus itumehu-EB:hen

30 min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,05	0,468	0,051	0,053	0,05	0,051	0,048	0,074	0,052	0,051	0,053	0,049
B	0,05	0,647	0,054	1,753	1,56	1,246	0,741	0,497	0,162	0,103	1,665	0,052
C	0,051	0,055	0,051	1,418	1,305	1,12	0,684	0,459	0,149	0,107	1,856	0,053
D	0,05	0,051	0,052	1,45	0,992	0,751	0,397	0,291	0,103	0,079	1,716	0,057
E	0,047	0,054	0,053	1,282	1,02	0,613	0,462	0,327	0,106	0,082	1,661	0,058
F	0,049	0,053	0,058	1,574	1,337	1,041	0,715	0,488	0,175	0,124	1,719	0,053
G	0,046	0,054	0,058	1,608	1,359	1,103	0,751	0,503	0,207	0,122	1,682	0,054
H	0,051	0,052	0,056	0,054	0,055	0,054	0,051	0,053	0,053	0,054	0,051	0,052

60 min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,058	0,944	0,053	0,056	0,053	0,054	0,051	0,079	0,055	0,053	0,057	0,055
B	0,051	1,005	0,057	2,605	2,506	1,968	1,228	0,808	0,242	0,13	2,503	0,055
C	0,051	0,057	0,053	2,462	2,361	1,94	1,183	0,72	0,21	0,15	2,731	0,055
D	0,052	0,053	0,055	2,15	1,651	1,302	0,777	0,487	0,153	0,105	2,652	0,063
E	0,048	0,058	0,059	2,028	1,788	1,1	0,768	0,505	0,153	0,109	2,728	0,069
F	0,052	0,055	0,067	2,746	2,324	1,836	1,289	0,907	0,32	0,194	2,771	0,058
G	0,047	0,057	0,065	2,754	2,371	1,878	1,34	0,977	0,335	0,2	2,855	0,057
H	0,053	0,056	0,06	0,056	0,058	0,059	0,054	0,059	0,056	0,062	0,055	0,057

130 min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,074	2,081	0,062	0,064	0,061	0,08	0,084	0,079	0,064	0,062	0,066	0,069
B	0,059	1,951	0,064	3,466	3,466	3,202	2,237	1,468	0,415	0,222	3,46	0,063
C	0,06	0,064	0,062	3,469	3,426	3,17	2,113	1,367	0,386	0,234	3,47	0,064
D	0,059	0,06	0,066	3,466	3,131	2,588	1,607	1,006	0,285	0,177	3,461	0,078
E	0,068	0,066	0,07	3,459	3,068	2,232	1,533	1,045	0,281	0,179	3,468	0,087
F	0,06	0,063	0,087	3,467	3,467	3,185	2,549	1,839	0,624	0,367	3,468	0,072
G	0,055	0,066	0,085	3,47	3,461	3,426	2,638	1,881	0,643	0,364	3,467	0,068
H	0,061	0,064	0,073	0,068	0,069	0,07	0,064	0,066	0,066	0,072	0,064	0,068

180 min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,084	2,597	0,069	0,071	0,067	0,072	0,067	0,087	0,07	0,069	0,076	0,083
B	0,065	2,524	0,07	3,467	3,41	3,27	2,805	1,939	0,55	0,29	3,467	0,073
C	0,067	0,071	0,067	3,468	3,467	3,329	2,761	1,814	0,503	0,298	3,467	0,073
D	0,068	0,067	0,074	3,405	3,449	3,15	2,119	1,339	0,365	0,222	3,466	0,089
E	0,063	0,072	0,077	3,391	3,43	3,004	2,016	1,385	0,368	0,227	3,469	0,104
F	0,067	0,069	0,103	3,466	3,467	3,469	3,058	2,411	0,843	0,496	3,467	0,079
G	0,061	0,073	0,1	3,47	3,459	3,447	3,23	2,493	0,86	0,482	3,468	0,076
H	0,067	0,071	0,083	0,075	0,08	0,079	0,07	0,075	0,074	0,078	0,07	0,078

240 min

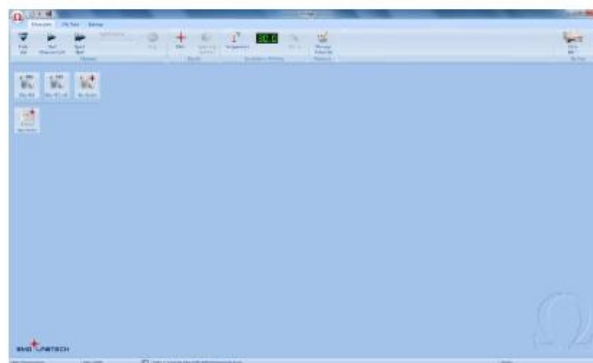
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,102	3,014	0,079	0,082	0,077	0,079	0,079	0,093	0,079	0,079	0,084	0,098
B	0,074	3,054	0,079	3,454	3,455	3,342	3,242	2,449	0,726	0,375	3,357	0,081
C	0,075	0,079	0,077	3,361	3,463	3,233	3,165	2,365	0,665	0,391	3,469	0,083
D	0,076	0,075	0,087	3,254	3,279	3,289	2,637	1,731	0,473	0,282	3,466	0,104
E	0,071	0,081	0,088	3,301	3,461	3,243	2,555	1,817	0,479	0,289	3,442	0,122
F	0,073	0,078	0,123	3,428	3,468	3,364	3,357	3,002	1,116	0,648	3,468	0,089
G	0,07	0,082	0,118	3,353	3,396	3,462	3,156	3,034	1,137	0,634	3,468	0,086
H	0,078	0,08	0,095	0,084	0,087	0,092	0,08	0,084	0,082	0,088	0,079	0,09

VIRUSLEVYJEN MITTAUS ORDIO FLUOSTAR OMEGA - MONILEIMALUKIJALLA

Laitteeseen kytketään virta takaa vasemmalta. Tietokoneessa on kaksi laitteeseen liittyvää ohjelmaa, joista Omega on mittausohjelma ja Omega Data Analysis tulostenkäsittelyohjelma. Käynnistettäessä ohjelmia valitaan käyttäjätunnus "user" ja painetaan "Run".

Mittaus

Kuvassa on Omega-mittausohjelma. Mitattaessa painetaan "Start Measurement"-kohtaa ja avautuvasta ikkunasta valitaan haluttu mittausprotokolla.



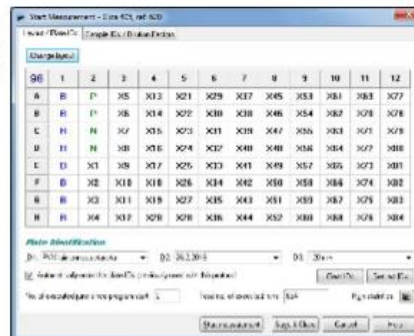
ELISA-virustestin levyjen mittaukseen on tehty kaksi mittausprotokollaa:

ELISA 405: mittaa absorbanssin aallonpituudella 405 nm

ELISA 405, ref. 620: mittaa absorbanssin aallonpituuksilla 405 nm ja 620 nm, joista jälkimmäistä käytetään referenssiaallonpituutena, koska se ei absorboitu testissä positiivisten näytteiden kohdalla muodostuvasta 4-nitrofenolista. Referenssiaallonpituuden tarkoituksena on poistaa taustasta ja mahdollisista epäpuhtauksista johtuvaa absorbanssia.

Kun mittausprotokolla on valittu, syötetään "ID"-kohtiin halutut tunnistetiedot, esimerkiksi levyn nimi, päivämäärä ja mittausaika. "Start measurement"-painike aloittaa mittauksen.

Ohjelma tallentaa mittaus tulokset itsestään, kun mittaus on valmis.



Tulosten tarkastelu

Avaa Omega Data Analysis -ohjelma ja valitse haluamasi mittaustulokset. Edellä mainittuja mittausprotokollia käytettäessä ohjelma avaa niille tehdyt templatet eli laskusäännöt, joiden pohjalta ohjelma laskee tulokset automaattisesti. ELISA-virustestille tehdyt templatet:

ELISA 405: matalan positiivisen raja on 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo, positiivisen raja on 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo + 0,05. Oletuksena mittausprotokollalle "ELISA 405".

ELISA 405, ref. 620: matalan positiivisen raja on 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo, positiivisen raja on 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo + 0,05. Oletuksena mittausprotokollalle "ELISA 405, ref. 620".

ELISA 405, ref. 620, vaihtoehtoinen laskutapa: matalan positiivisen raja on 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo, positiivisen raja on 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo + negatiivisten kontrollien keskihajonta.

Templatea voidaan tarvittaessa vaihtaa kuvan ympyröidystä kohdasta. Joskus ohjelma ei näytä tuloksia oikein vaan kaikki kaivot näkyvät positiivisena. Tällöin valitaan samasta kohdasta haluttu template, jolloin ohjelma päivittää näkymän oikeaksi.

The screenshot shows the Omega Data Analysis software interface. The main window displays a data table with 12 columns and 10 rows of numerical data. The values are as follows:

0,058	0,944	0,053	0,056	0,053	0,054	0,051	0,079	0,055	0,053	0,057	0,055
0,051	1,005	0,057	2,605	2,506	1,968	1,228	0,808	0,242	0,13	2,503	0,055
0,051	0,057	0,053	2,462	2,361	1,94	1,183	0,72	0,21	0,15	2,731	0,055
0,052	0,053	0,055	2,15	1,651	1,302	0,777	0,487	0,153	0,105	2,652	0,063
0,048	0,058	0,059	2,028	1,788	1,1	0,768	0,505	0,153	0,109	2,728	0,069
0,052	0,055	0,067	2,740	2,324	1,836	1,289	0,907	0,32	0,194	2,771	0,058
0,047	0,057	0,065	2,754	2,371	1,878	1,34	0,977	0,335	0,2	2,855	0,057
0,053	0,056	0,06	0,056	0,058	0,059	0,054	0,059	0,056	0,062	0,055	0,057

A red circle highlights a dropdown menu in the top right corner of the software window, which is used for selecting the calculation template.

UUDEN TEMPLATEN LUOMINEN

Tulostenkäsittelyohjelmalla voidaan luoda monimutkaisiakin laskusääntöjä tulosten automaattiseen laskentaan. Laitteen oma käyttöopas ei juurikaan opasta siihen ja ohjelman käyttöliittymä on melko monimutkainen. Seuraavassa on yritetty esimerkin kautta opastaa templatien luomisessa. Esimerkkinä luodaan template seuraavilla säännöillä:

mittausaallonpituus: 405 nm

referenssiaallonpituus: 620 nm

matalan positiivisen raja: 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo

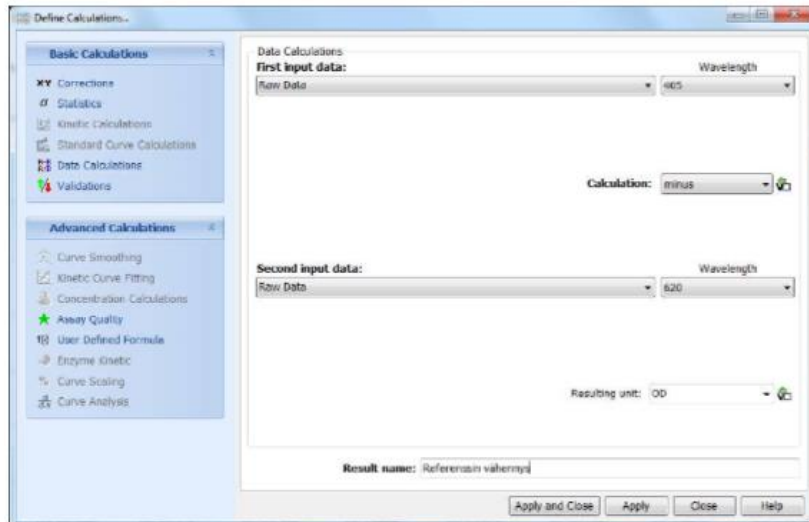
positiivisen raja: 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo + negatiivisten kontrollien keskihajonta

1. Aluksi avataan sellainen mittaustulos, jossa on käytetty aallonpituuksia 405 nm ja 620 nm. Poistetaan tarvittaessa kaikki edelliset laskusäännöt painamalla hiiren oikealla painikkeella mittauksen nimeä "Available Data"-kohdan alapuolelta ja valitsemalla "Clear Test Run Settings".

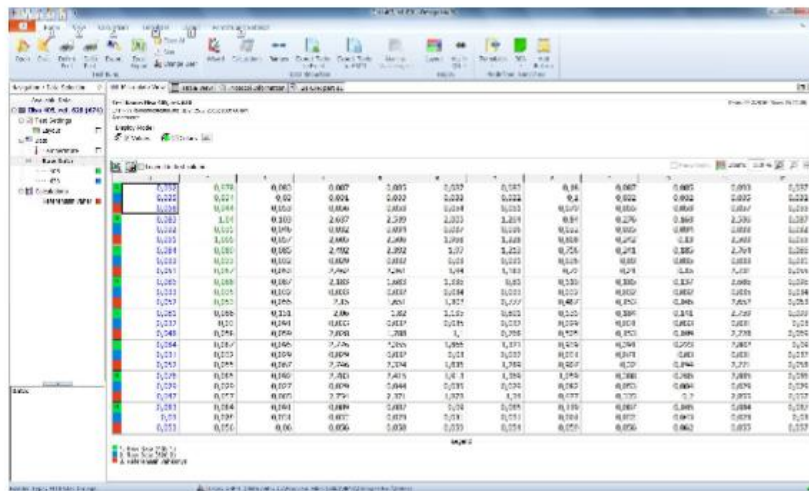
Alla olevassa kuvassa mitään laskusääntöjä ei ole vielä määritelty. Kuvassa näkyy Raw Data eli tässä tapauksessa absorbanssit kahdelta aallonpituudelta, joista aallonpituutta 620 nm käytetään tässä tapauksessa referenssinä.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,092	0,978	0,083	0,087	0,085	0,087	0,083	0,18	0,087	0,085	0,093	0,087	
0,035	0,034	0,03	0,031	0,033	0,033	0,032	0,1	0,032	0,032	0,035	0,032	
0,083	1,04	0,103	2,637	2,539	2,005	1,264	0,84	0,276	0,163	2,536	0,087	
0,032	0,035	0,046	0,032	0,034	0,037	0,036	0,032	0,035	0,034	0,033	0,032	
0,084	0,089	0,085	2,492	2,392	1,97	1,213	0,756	0,241	0,185	2,764	0,086	
0,033	0,033	0,032	0,029	0,032	0,03	0,031	0,036	0,03	0,035	0,033	0,031	
0,085	0,088	0,087	2,183	1,683	1,336	0,81	0,519	0,185	0,137	2,686	0,096	
0,033	0,035	0,032	0,033	0,032	0,034	0,033	0,032	0,032	0,032	0,035	0,034	
0,081	0,088	0,151	2,06	1,82	1,135	0,801	0,535	0,184	0,141	2,759	0,099	
0,032	0,03	0,091	0,033	0,032	0,035	0,032	0,029	0,031	0,033	0,031	0,03	
0,084	0,087	0,095	2,776	2,355	1,866	1,371	0,939	0,391	0,273	2,807	0,09	
0,031	0,032	0,029	0,029	0,032	0,03	0,032	0,031	0,071	0,03	0,031	0,032	
0,076	0,085	0,092	2,783	2,415	1,913	1,369	1,059	0,388	0,285	2,885	0,086	
0,079	0,079	0,077	0,079	0,044	0,035	0,079	0,087	0,053	0,084	0,079	0,079	
0,083	0,084	0,091	0,089	0,087	0,09	0,085	0,119	0,087	0,105	0,084	0,087	
0,03	0,029	0,031	0,032	0,029	0,031	0,031	0,061	0,032	0,043	0,029	0,03	

2. Aloitetaan vähentämällä referenssiaallonpituuden 620 nm absorbanssi varsinaisesta mittausaallonpituudesta 405 nm. Painetaan "Calculations"-painiketta ylävalikosta ja valitaan avautuvasta ikkunasta "Data Calculations". Tehdään kuvan mukaiset valinnat ja annetaan tuloksen nimeksi esimerkiksi "Referenssin vähennys". Painetaan "Apply and Close".



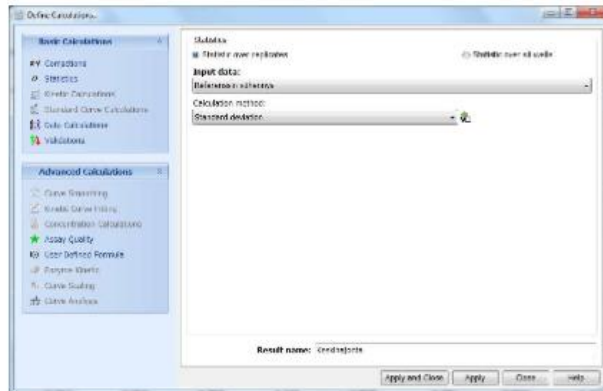
Levynäkymään ilmestyy tämä laskettu arvo jokaisen kaivon kohdalle.



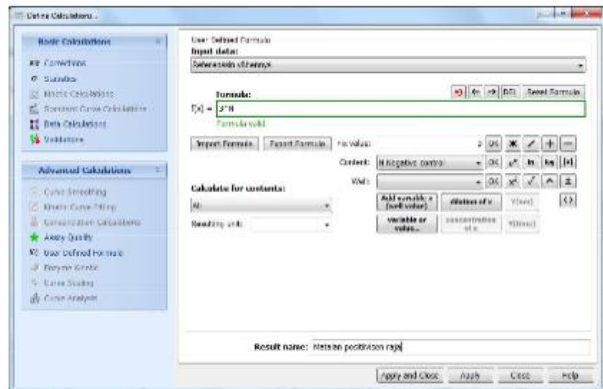
3. Seuraavaksi määritetään positiivisen ja matalan positiivisen tuloksen rajat. Käytetään seuraava vähimmäisrajoja:

- Positiivinen: 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo + negatiivisten kontrollien keskihajonta
- Matala positiivinen: 3 x negatiivisten kontrollien keskiarvo

Määritetään keskihajonta painamalla "Calculations"-painiketta ja valitsemalla "Statistics"-kohta. Tehdään kuvan mukaiset valinnat ja annetaan tuloksen nimeksi esim. "keskihajonta". Painetaan "Apply". Ohjelma laskee keskihajonnan kaikille rinnakkaisille kontrolleille ja näytteille.

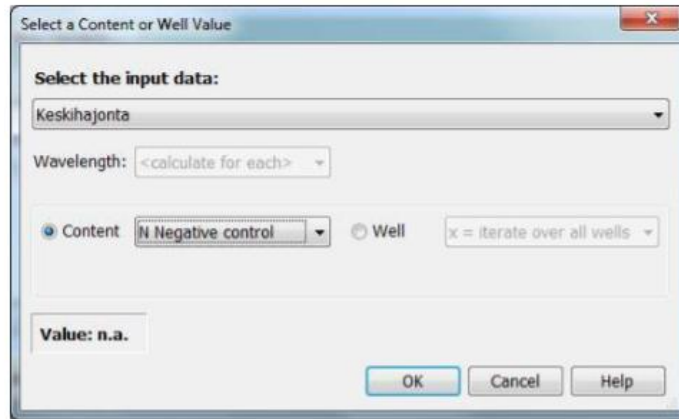


4. Valitaan "Define Calculations..."-ikkunasta kohta "User Defined Formula". Syötetään kuvien mukaisesti valinnat ja laskutoimitukset. Laskutoimituksia ei voi kirjoittaa suoraan näppäimistöllä, vaan ne pitää syöttää annetuilla painikkeilla. Kuvassa "Content"-kohdassa näkyvä "N Negative control" on negatiivisten kontrollien keskiarvo ja se näkyy "Formula"-kohdassa kirjaimena "N". Keskiarvoa ei siis tarvitse laskea erikseen. Painetaan "Apply" ja ohjelma laskee arvon matalalle positiiviselle tulokselle.

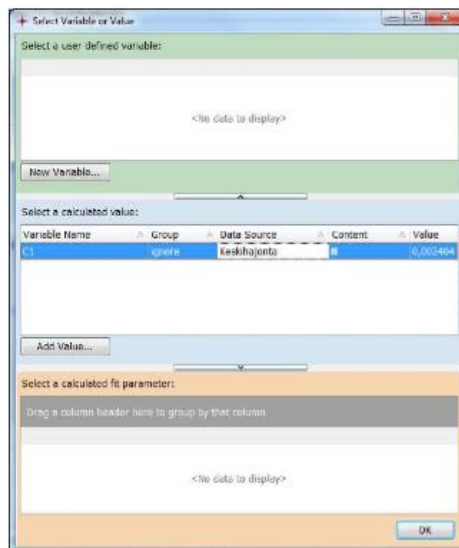


Positiivisen tuloksen raja on tämän esimerkin tapauksessa sama kuin matalan positiivisen raja, mutta siihen on lisätty vielä negatiivisten kontrollien keskihajonta. Tämä arvo pitää hakea painikkeesta

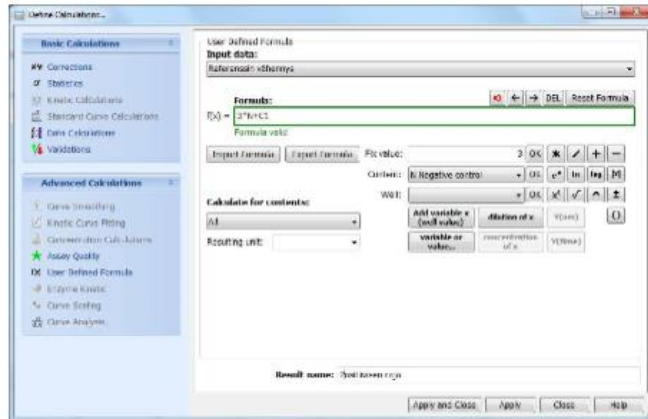
"variable or value...". Avautuvasta ikkunasta valitaan "Add Value...", jonka jälkeen avautuu uusi ikkuna, josta valitaan haluttu arvo kuvan mukaisesti. Painetaan "OK".



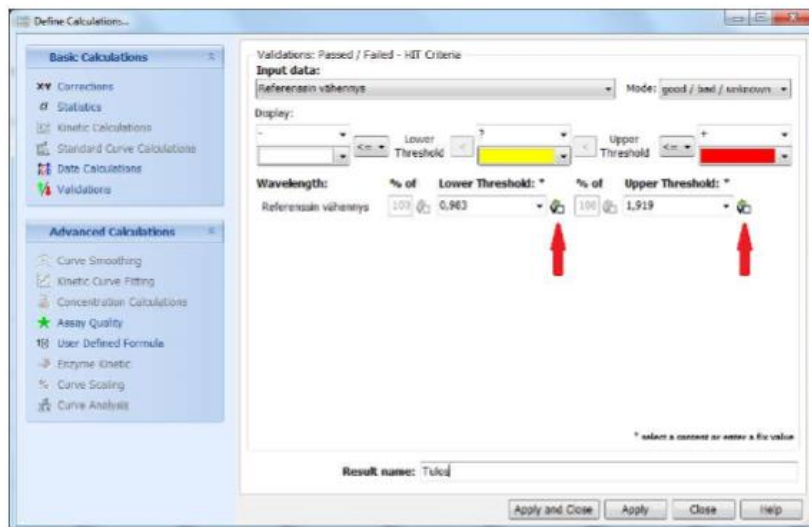
Ohjelma on antanut tälle arvolle nimeksi "C1". Valitaan se kuvan mukaisesti ja painetaan "OK".



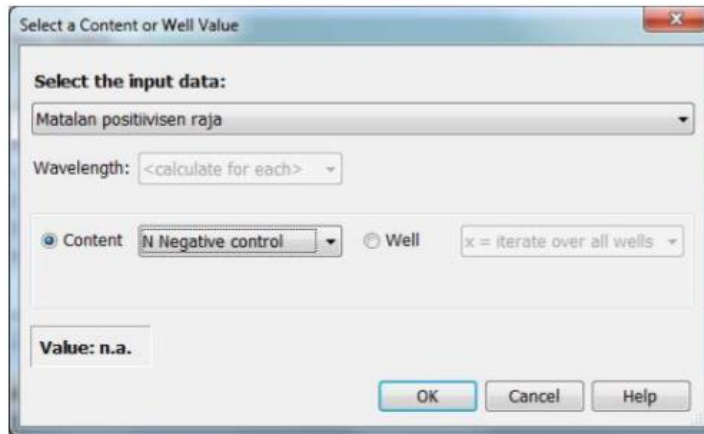
Positiivisen tuloksen laskutoimitus on seuraavan kuvan mukainen. Painetaan jälleen Apply.



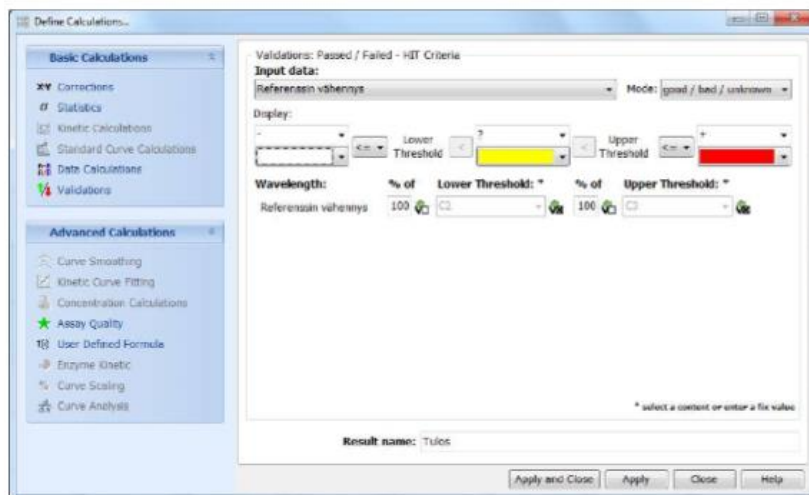
5. Nyt rajat on laskettu, mutta ohjelma on vielä määritettävä käyttämään niitä. Valitaan "Define Calculations..."-ikkunasta kohta "Validations". Tässä kohdassa voidaan valita symbolit ja värit esittämään negatiivista, matalaa negatiivista ja positiivista tulosta. Kuvaa on merkitty kohdat joista voidaan hakea laskettuja arvoja vastaavasti kuin edellisessä kohdassa.



Haetaan arvot kuten aikaisemmin, mutta valitaan keskihajonnan sijaan matalan positiivisen ja positiivisen arvot. "Content"-kohtaan on valittava joku kaivo, vaikka nämä rajat ovat kaikille kaivoille samat. Valitaan esimerkiksi "N Negative control".

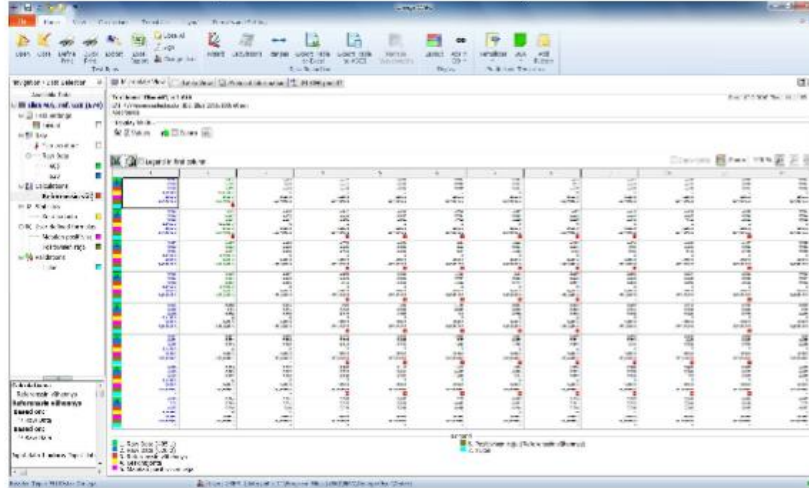


Kun arvot on haettu, "Validations"-kohta näyttää suunnilleen seuraavalta:

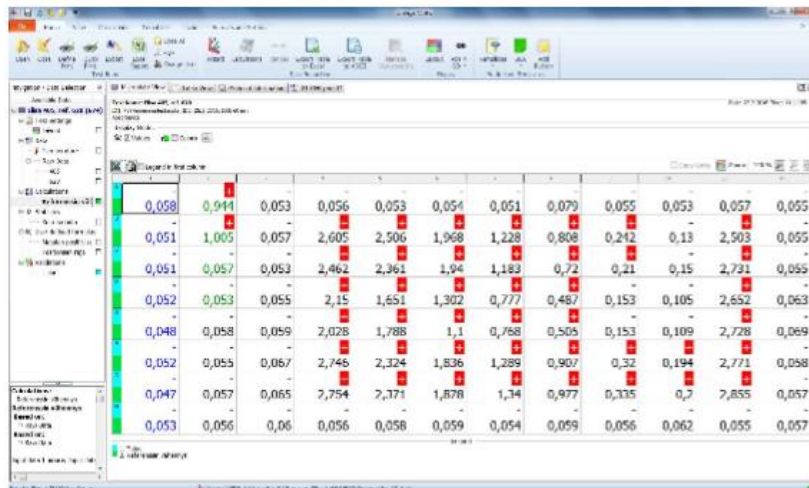


Ohjelma antoi tässä tapauksessa matalan positiivisen arvon tunnukseksi "C2" ja positiivisen arvon tunnukseksi "C3". Painetaan "Apply and Close".

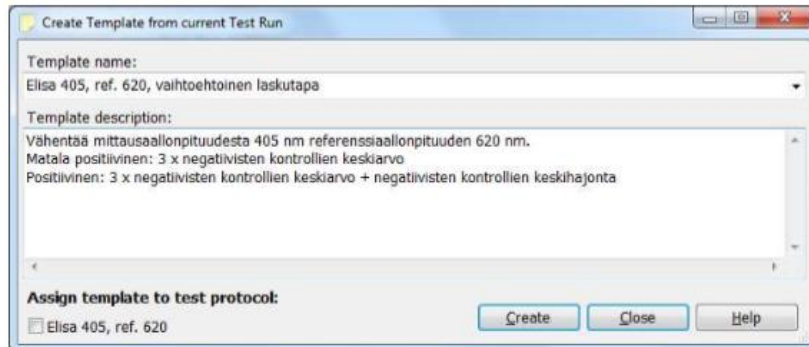
6. Tässä kohdassa näkymä on aika sekava, koska näkyvissä on kaikki laskutoimitukset.



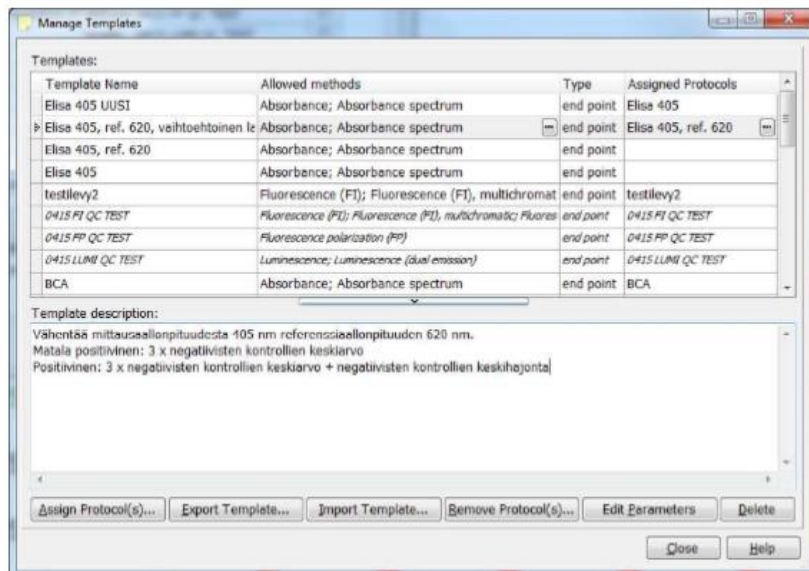
Painetaan vasemmalla olevasta "Available Data"-kohdasta värillisiä valintapainikkeita niiden tietojen kohdalta, joiden ei tarvitse näkyä. Jätetään näkyville "Referenssin vähennys" ja "Tulos".



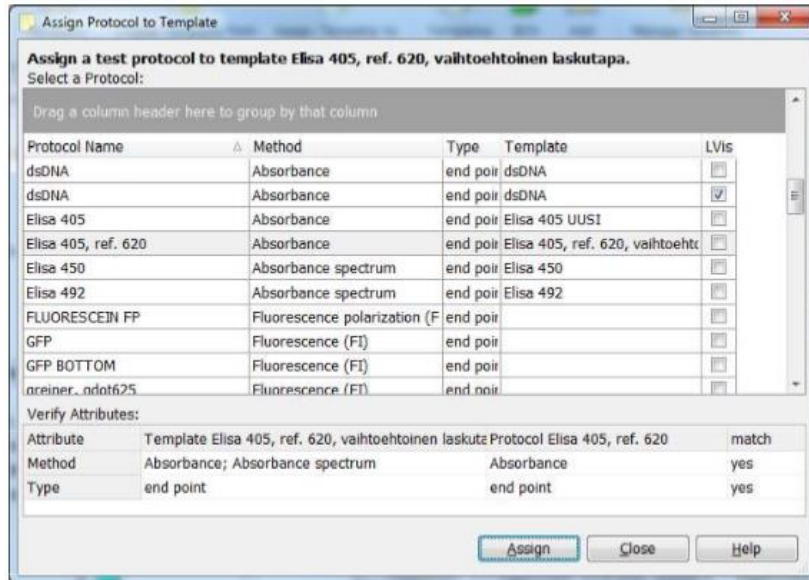
7. Template on nyt valmis. Tallennetaan se valitsemalla "File"-kohdasta "Save" ja sen jälkeen "Create Template". Valitaan templatelle nimi ja kirjoitetaan kuvaus. Painetaan "Create".



8. Tämän jälkeen template voidaan asettaa oletukseksi halutulle mittausprotokollalle, jolloin ohjelma käyttää templatea automaattisesti, kun kyseisellä mittausprotokollalla mitattu tulos avataan ohjelmassa. Valitaan ylävalikosta kohta "Templates" ja sen jälkeen painike "Manage Templates". Valitaan juuri tallennettu template ja painetaan "Assign Protocol(s)..."



Valitaan haluttu mittausprotokolla, tässä tapauksessa "Elisa 405, ref. 620", ja painetaan "Assign".



Tämän jälkeen uusia mittauksia tarkasteltaessa ohjelma valitsee automaattisesti valitun templatien ja laskee tulokset.