

RESÜMEE

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni tehnoloogia kasutusele võtuga arenes geeni ekspressiooni uurimine oluliselt, kuna see meetod võimaldab võrreldes varasemate meetoditega suuremat tundlikkust ja täpsust mRNA koguse hindamiseks uuritavas materjalis. Nimetatud meetodid omab väga laia mõõtevahemikku, mis võib olla kuni 10 suurusjärku. Lisaks on mainitud meetod korrektse katseteetodika korral ka täpsem kui teised olemasolevad meetodikad. Seetõttu on meetod saavutanud teadlaskonnas suure populaarsuse ja seda hinnatakse kui täpsuse standardit mRNA kvantifitseerimise valdkonnas. Tehnoloogia rakendamiseks on lugematul arvul erinevaid meetodikaid loodud, kuid kõige olulisematena neist võiks nimetada absoluutset ja relatiivset kvantifitseerimist. Absoluutse kvantifitseerimise korral kasutatakse andmete normaliseerimiseks täpselt teadaoleva kontsentratsiooniga kalibreerimiskõverat ehk välist normaliseerimisfaktorit. Relatiivse meetodi puhul on normaliseerimisfaktoriks juba proovis olemasolevad mRNA järjestused, mis kuuluvad geenidele, mille ekspressiooni stabiilsust antud katse tingimustes hinnatakse heaks. Seega on need järjestused natiivseks sisemiseks kontrolliks ning peavad taluma ühevaarselt sihtmärk RNA järjestustega kõiki protseduure, mis eelnevad ja toimuvad qPCR-i käigus. Selline lähenemine lihtsustab oluliselt katse läbiviimise tehnilist keerukust ja tõstab katse korratavust ka erineva kogemuste pagasiga uurijate korral. Kuid kõik see eeldab, et kasutatav relatiivne kvantifitseerimis meetodika on eelnevalt korrektselt valideeritud ning selle vajadust toonitavad kõik selle valdkonna juhtivad autorid. Mitmes qPCR meetodika kasutamisest käsitlevas ülevaateartiklis on jõutud arusaamisele, et viimati nimetatud asjaolu on jäetud väärilise tähelepanuta või sootuks unustatud. See võib olla aga väga suur viga, kuna siiani ei ole tuvastatud ühegi uuritud organismi geeni, mille ekspressiooni tase oleks alati stabiilne. Pigem arvatakse, et sellist geeni ei olegi olemas. On arusaadav, et ebastabiilsete geenide kasutamisega kvantifitseerimise protsessis saadakse andmed, mille alusel tehtud järeldused võivad olla täiesti valed.

Eelpool nimetatud qPCR kasutamise probleemidest ja headest tavadest lähtudes, otsustati leida keraheina laiguviirusega nakatatud ja nakkunud nisu taime sordile “Zebra” sobilikud referentsgeenid. Selleks valiti kirjanduse andmetel stabiilseks hinnatud referentsgeenid, mis sobiksid kasutamiseks meie konkreetses nisu sordis ja CfMV-ga nakataimsel esinevates tüüpilistes

katsetingimustes. Selleks koostati valideerimisprotsess, kus esiteks hinnati primerpaaride efektiivust amplifitseerida vastavat järjestust, teiseks hinnati referentsgeenide stabiilsust kolme erineva inokuleerimise meetodika puhul ning kolmandaks hinnati referentsgeenide stabiilsust nii lokaalse kui ka süsteemse nakkuse esinemise korral.

Valideerimisprotsessi käigus kirjeldati ja mõõdeti valitud referentsgeenide primerpaaride võimet amplifitseerida sihtmärk järjestust. Selleks koostatud standardkõvera analüüsil selgus, et kõik referentsgeenide kandidaadid omavad piisavalt kõrget amplifitseerimise efektiivsust meie katsetingimustel. Lisaks sooviti hinnata ka individiaalsetes proovides esinevat amplifikatsiooni efektiivsust, kasutades selleks ka LinRegPCR programmi, mis võimaldab arvutada efektiivsust igale proovile individuaalselt nende amplifikatsiooni kõvera alusel. See protseduur ei andnud kahjuks soovitud tulemust, kuna leitud efektiivsused oli liiga madalad ning efektiivuse hinnangutes esines suur varieeruvus.

Viimasena analüüsiti referentsgeenide stabiilsust eelpool nimetatud kolme peamise võimaliku mõjutaja suhtes. Selleks kasutati kolme erinevat referentsgeenide stabiilsuse hindamise meetodit, mille tulemusena määrati geenide stabiilsuse järjekord ning leiti, et referentsgeenid GAPDH, CDC ja 18S ekspresseeruvad normaliseerimiseks piisavalt stabiilselt.