

USPOREDBA KVALITETE RNA IZOLIRANE IZ TKIVA KALIFORNIJSKE PASTRVE (*Oncorhynchus mykiss*) PRIPREMLJENOG NA ČETIRI RAZLIČITA NAČINA

I. Vardić, E. Teskeredžić

Sažetak

Brza i precizna dijagnostika bolesti riba u uzgoju je važna radi pravodobnog sprječavanja velikih gubitaka. Tehnike molekularne biologije stoga nalaze veliku primjenu u području akvakulture. Prvi korak u takvim istraživanjima jest izolacija DNA ili RNA. Priprema tkiva za izolaciju RNA koja će poslužiti za daljnju analizu RT-PCR-om (reverzna transkripcija–lančana reakcija polimerazom) ključni je korak o kojem ovisi cijeli postupak analize. Svrha našeg istraživanja bila je usporediti kvalitetu i integritet RNA molekula izoliranih iz tkiva kalifornijske pastrve pripremljenog na četiri načina: svježe tkivo, smrznuto tkivo, tkivo fiksirano u metakarnu i uklopljeno u parafin i tkivo fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafin. Izolirana RNA analizirana je elektroforetski na 1%–tnom, nedenaturirajućem agaroznom gelu. Njezina kvaliteta i integritet provjereni su u RT-PCR reakciji s početnicama za β -aktin. Dodatno je provjerena i prisutnost virusa virusne hemoragične septikemije (VHS) i infektivne hematopoezne nekroze (IHN) iz ovako obrađenoga tkiva u RT-PCR reakciji s početnicama specifičnima za ove viruse. Visoku kvalitetu, integritet i količinu imala je RNA izolirana iz svježega i smrznutoga tkiva. RNA izolirana iz tkiva fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin bila je degradirana, ali je dala očekivane produkte u reakciji RT-PCR s početnicama za β -aktin. Ovakvi produkti reakcije RT-PCR nisu dobiveni kada je rabljena RNA izolirana iz tkiva riba fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin, što je u skladu s literaturnim podacima o agresivnom djelovanju formalina kao fiksatora na RNA u tkivu. Pregledane ribe nisu bile zaražene virusima VHSV i IHNV, što je bilo u skladu s anamnezom te kliničkim, patološkoanatomskim pregledom. Prema našim spoznajama, ovo je prva uspješna izolacija RNA iz tkiva riba fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin, a koja se dalje može

Irena Vardić, dipl. ing., dr. sc. Emin Teskeredžić, znanstveni savjetnik, Institut Ruder Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska, e-mail: ivardic@irb.hr

rabiti u analizi RT-PCR. Metoda je jednostavna i relativno jeftina, a tkivo uklopljeno u parafin može se čuvati godinama, te je naša pretpostavka da bi se moglo upotrijebiti i za detekciju patogena (virusa) i za analizu genske ekspresije na razini mRNA, što ćemo pokušati potvrditi u našim budućim istraživanjima.

Ključne riječi: *kalifornijska pastrva, metakarn, izolacija RNA, RT-PCR, VHSV, IHNV*

UVOD

Akvakultura je važna poljoprivredna djelatnost koja posljednjih godina bilježi stopu razvoja od 10% godišnje i sada iznosi 44 milijuna tona, odnosno oko 40% cjelokupnog izlova iz voda (EireStat, 2001). Uspjeh uzgoja, osim o kvaliteti vode i tehnologiji uzgoja, znatno ovisi i o zdravstvenom stanju riba. Bolesti uzrokuju velike gubitke pa stoga razvoj brzih dijagnostičkih metoda za njihovu identifikaciju ima izuzetno značenje u smanjenju gubitaka te sprječavanju širenja uzročnika prijevozom žive ribe (Einer-Jensen i sur., 2002).

Zahvaljujući spoznajama u molekularnoj biologiji razvijen je velik broj metoda koje su atraktivna opcija za istraživanje bolesti riba na molekularnoj razini. Takve su: *in situ* hibridizacija s DNA probama, lančana reakcija polimerazom (PCR, od engl. polymerase chain reaction), analize restriktijskim enzimima kao što je RFLP (od engl. restriction fragment length polymorphism) te sekvencioniranje DNA (Einer-Jensen i sur., 2002).

Lančana reakcija polimerazom (PCR) znatno je unaprijedila rad na području molekularne biologije i poboljšala dijagnostiku različitih bolesti, prije svega preciznošću i brzinom. Ona se temelji na umnožavanju specifičnoga slijeda u određenom, ciljnom genu u nekoliko milijuna kopija u kratkom periodu (Winton i Einer-Jensen, 2002). Danas postoji velik broj različitih verzija ove metode. Vrlo često upotrebljava se RT (reverzna transkripcija) — PCR, prije svega ako je početni materijal u istraživanju RNA, što je slučaj s mnogim virusima riba koji kao genomsku nukleinsku kiselinu imaju RNA. Prvi korak u RT-PCR metodi jest stvaranje komplementarnog lanca DNA (cDNA, od engl. complementary DNA) iz RNA s pomoću enzima reverzne transkriptaze. cDNA je kalup za umnožavanje određenog odsječka DNA u idućoj reakciji PCR.

Ključni korak u svim verzijama reakcije PCR jest priprema tkiva i izolacija DNA, tj. RNA. Najbolji izvor tkiva jest svježi materijal, što bi značilo da cjelokupnu opremu zajedno sa sterilnom prostorijom treba imati u blizini mjesta uzorkovanja. U akvatičnim istraživanjima to je najčešće nemoguće, jer su dijagnostički laboratoriji veoma udaljeni od mjesta uzorkovanja. Stoga riblje tkivo treba pravilno pripremiti za daljnju obradu.

Najčešće se komadi izoliranoga tkiva spremaju u tekući dušik ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Oni se u laboratoriju dalje pohrane u ledenice na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, gdje mogu stajati više mjeseci bez negativnog utjecaja na količinu i integritet RNA, ili se odmah iz tekućeg dušika upotrebljavaju za izolaciju RNA (Sambrook i sur., 2001).

Drugi je način fiksiranje tkiva u nekom fiksatoru i uklapanje u parafin. Takav se arhivski materijal može upotrijebiti za identifikaciju infektivnih patogena i za analizu ekspresije gena (Lewis i sur., 2001). Fiksirano tkivo uklopljeno u parafin može se čuvati tijekom dugog razdoblja, a uspješne izolacije RNA izvedene su i iz tkiva starog 20 godina (Combs i sur., 1999). Na taj je način moguće sakupiti cijelu biblioteku svih poznatih bolesti npr. u ribljih organizama. Zbog toga se ulažu veliki naponi u razvijanje ove metode.

Ipak, znanstvenici su naišli na brojne probleme u procesu izolacije RNA iz arhivskoga tkiva još od trenutka kada su Rupp i Locker (1988) prvi put objavili uspješnu izolaciju RNA iz tkiva fiksiranog u formalinu. Jedna od osnovnih poteškoća jest to što je količina RNA izolirane iz takvoga tkiva često nedovoljna za daljnju analizu. RNA je veoma labilna molekula i proces fiksacije i uklapanja u parafin uzrokuje njezinu veliku degradiranost. Tako pokušaji da se umnože fragmenti dulji od 200 pb u reakciji PCR najčešće završavaju neuspješno, pa zato treba izbjegavati umnožavanje dugačkih fragmenata (Jung i sur., 2003).

Utjecaj fiksativa na strukturu RNA koju želimo izolirati iz tkiva je različit. Formalin dovodi do ukriženog vezanja nukleinskih kiselina i proteina te kovalentno modificira RNA dodavanjem monometilnih skupina na nukleotidne baze. Ipak, ovakva je modifikacija reverzibilna i zagrijavanjem RNA u TE puferu na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ monometilne skupine se otpuštaju (Masuda i sur., 1999).

Chomzynski i Sacchi (1987) objavili su gvanidinium tiocijanat-fenol-kloroform proceduru za izolaciju RNA iz nefiksiranoga tkiva. Ovo je jedna od najčešće primjenjivanih metoda za izolaciju RNA i bila je polazište za proizvodnju reagenasa koje danas prodaju brojni proizvođači, a omogućuju izolaciju RNA u roku od jednog sata: Trizol (Invitrogen), TRI reagensija (MRC Inc., SAD), Rneasy (Quiagen), Purescript (Gentra), Totally RNA (Ambion), (Lewis i sur., 2001).

Izolacija RNA iz tkiva fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin zahtijeva dodatne korake, a jedna od najuspješnijih metoda uključuje upotrebu digestije s pomoću proteinaze K. Ovaj enzim omogućuje kidanje ukriženih veza između nukleinskih kiselina i proteina, pa RNA ostaje u slobodnom obliku za izolaciju (Masuda i sur., 1999).

Combs i suradnici (1999) savjetuju upotrebu termalnog bloka i Chelex-100 za uspješnu izolaciju RNA i DNA iz arhivskog materijala, dok se Koopmans i suradnici (1993) koriste metodom koja se temelji na vezanju RNA na staklene kuglice tretirane kiselinom u prisutnosti visokomolarne soli gvanidiniuma, koja je pokazala dobre rezultate u izolaciji RNA iz tkiva fiksiranog u acetonu.

Metakarn je fiksativ koji ne uzrokuje ukriženo vezivanje nukleinskih kiselina i proteina. Upotrijebili su ga Shibutani i suradnici (2000) za kvantitativnu analizu ekspresije gena i proteina. Integritet izolirane RNA iz staničnih kultura štakora koje su fiksirane u metakarnu bila je zadovoljavajuća i usporediva s nefiksiranim, zamrznutim stanicama. Nakon RT-PCR analize bilo je moguće detektirati produkte duljine 300–700 pb. Razina kontaminacije genomskom DNA bila je niža nego kod nefiksiranog, smrznutog tkiva.

Riblji rabdovirusi kao što su virus virusne hemoragične septikemije (VHS) i infektivne hematopoezne nekroze (IHN) uzrokuju znatne gubitke u uzgoju pastrva i lososa širom svijeta (Winton i Einer-Jensen, 2002). Obje su bolesti karakterizirane akutnom viremijom koja rezultira hemoragijom i širenjem nekroze u glavnim organima riba.

Virusna hemoragična septikemija ili Egtvedova bolest najznačajnija je virusna bolest uzgojenih kalifornijskih pastrva, *Oncorhynchus mykiss*, u Europi (Woo i Bruno, 1999). Uzročnik je virus koji ima oblik puščanog metka, širine 70 nm i duljine 180 nm. Virusni genom čini negativna jednolančana RNA, a uz nju su prisutni proteini: N — nukleoprotein, M1 i M2 — proteini matriksa, G — glikoprotein, NV — nevirusni protein, L — RNA ovisna DNA polimeraza. Osim kalifornijske pastrve, u koje je prvi put otkrivena, ova bolest, virus je pronađen i u najmanje 16 različitih slatkovodnih i morskih ribljih vrsta, a neprestano se objavljuju nove vrste u kojima se detektira VHS (Isshiki i sur., 2001).

Infektivna hematopoezna nekroza (IHN) također izaziva letalne bolesti u brojnih salmonidnih vrsta, a zabilježena je i u slatkovodnih i u morskih riba. Virusna čestica ima oblik puščanog metka širine 65 nm i duljine 190 nm, a genomna RNA i proteini koji izgrađuju česticu slični su kao u VHSV (Williams i sur., 1999; Bergmann i sur., 2003).

Detekciju tih virusa metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) uz različite setove početnica opisalo je više autora (Winton i Einer-Jensen, 2002).

Bruchoff i suradnici (1995) potvrdili su da se VHSV i IHNV ne mogu razlikovati na razini genomske sekvence proteina N. Spomenuti autori stoga predlažu upotrebu početnica koje su konstruirane za amplifikaciju odsječka gena za protein G, jer se VHSV i IHNV razlikuju u nukleotidnom slijedu gena za protein G.

Cilj je rada bio razviti metodu za pripremu tkiva za izolaciju RNA, zatim provesti izolaciju s pomoću Tri reagensa (MCB, Inc., SAD), te provjeriti kvalitetu i integritet izolirane RNA u reakciji PCR s pomoću početnica za β -*aktin* (gen izražen u svim stanicama). Nadalje, željeli smo provjeriti prisutnost VHSV i IHNV u tkivu metodom RT-PCR s pomoću početnica specifičnih za ove viruse.

MATERIJAL I METODE

Priprema ribljega tkiva

Pet jedinki kalifornijske pastrve, *Oncorhynchus mykiss*, obaju spolova i dobi 18 mjeseci, nasumično su vađene sakovima na uzgajalištu. Ribe su pohranjene u prijenosne hladnjake s ledom i prevezene u laboratorij u roku manje od 1 sat.

Načinjen je zdravstveni pregled riba u tijeku kojeg su ribe usmrćene, a zatim su im uzeti dijelovi ovih tkiva: jetre, slezene, srca, bubrega, gonada i mozga. Komadići svih tkiva veličine 100 mg pojedinačno su dalje obrađeni na četiri načina:

- **Svježe tkivo** — na uzorke dodan Tri reagens (MRC Inc., SAD) i odmah izvedena izolacija RNA.
- **Smrznuto tkivo** — uzorci preneseni u kriotubice i pohranjeni u tekući dušik tijekom nekoliko dana.
- **Tkivo fiksirano u metakarnu i uklopljeno u parafin** — fiksacija u metakarnu na sobnoj temperaturi trajala je 1 h. Metakarn je otopina 60% apsolutnog metanola, 30% kloroforma i 10% octene kiseline. Pripremljena je neposredno prije fiksacije.
- **Tkivo fiksirano u formalinu i uklopljeno u parafin** — fiksacija u 10 %-tnom puferiranom formalinu na sobnoj temperaturi trajala je 24–48 h. Formalin je pripremljen neposredno prije fiksacije.

Izolacija RNA iz svježeg i smrznutog tkiva

Uzorci svježega tkiva preneseni su u sterilne tubice i na to je dodan 1 ml Tri reagensa. Tkivo je homogenizirano tijekom 40 s. RNA je zatim izolirana postupkom koji su preporučili proizvođači Tri reagensa (MRC Inc., SAD). Dobivena RNA otopi se u DEPC vodi.

Smrznuti se uzorci nakon vađenja iz tekućeg dušika brzo otope i na njih se doda 1 ml Tri reagensa. Izolacija RNA nakon homogenizacije provede se kao i kod svježega tkiva.

Izolacija RNA iz tkiva fiksiranog u metakarn i formalin i uklopljen u parafin

Izolacija RNA iz tkiva fiksiranog u metakarnu i formalinu te uklopljenog u parafin provodi se prema prethodno opisanom postupku (Körbler i sur., 2003) s malim modifikacijama.

Nakon fiksacije, uzorci su dehidrirani u rastućem gradijentu etanola i uklopljeni u parafin u histokinetu. Na mikrotomu su izrezani rezovi debljine 10–15 μm i uneseni u sterilne tubice (2–3 reza). Uzorci uklopljeni u parafin ostavljeni su mjesec dana na sobnoj temperaturi prije daljnje obrade.

Proces deparafinizacije uključivao je ispiranje ksilenom i etanolom, nakon čega su osušeni talozi resuspendirani u otopini bez inhibitora RNaza (10 mM NaCl, Tris pH 7,6, 20 mM EDTA, 1 % SDS) kojoj je dodana proteinaza K. Uzorci su inkubirani tijekom noći (16 sati) na 45 °C uz periodično miješanje. Nakon inaktivacije proteinaze K dodan je Tri reagens i daljnji postupak izolacije bio je isti kao za svježije tkivo.

Gel-elektroforeza RNA

Kvalitetu izolirane RNA provjerili smo elektroforezom na 1%-tnom nede-naturirajućem, agaroznom gelu, kojem je dodan etidij-bromid (0,5 g/mL). Pri tom je upotrijebljen 1xTAE pufer (nije obrađen DEPC vodom). Kadica za gel-elektroforezu nije tretirana protiv razgradnje RNA RNazama. Rezultati su dokumentirani Polaroid GelCam kamerom.

Kvantiteta RNA provjerena je mjerenjem apsorbancije na 260 nm i 280 nm u spektrofotometru (Ultraspec 2100 pro UV/visiable spectrophotometer).

Reverzna transkripcija — lančana reakcija polimerazom (RT-PCR)

Integritet RNA dokazan je u reakciji RT-PCR s početnicama za β -aktinski gen. Reakcija reverzne transkripcije izvedena je prema protokolu koji su opisali proizvođači SuperScript II reverzne transkriptaze (Invitrogen). U reakciji je upotrijebljeno 125 ng nasumičnih heksanukleotidnih početnica (Invitrogen) i 1 μ g RNA u ukupnom volumenu od 20 ml reakcijskog pufera. Uvjeti u kojima se reakcija zbivala bili su ovi: 5 minuta na 65 °C, 50 minuta na 42 °C te 15 minuta na 70 °C. Dva μ l od dobivene cDNA uporabljeno je u reakciji PCR s ovim komponentama: 1 x PCR pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM Mg²⁺), 0,2 mM dNTP, 2U Taq DNA polimeraza (Eppendorf), te 10 pmol početnica BT1 (5'-CAGGGAGAAGATGACCCAGAT-3') i BT2 (5'-GATACCGCAAGACTCCATACC-3'). Početnice BT1/BT2 koje su ovdje rabljene za detekciju gena za β -aktin u kalifornijskim pastrvama, *Oncorhynchus mykiss*, mogu se upotrijebiti i za umnožavanje segmenta β -aktinskog gena lubina, *Dicentrarchus labrax* (Valle i sur., 2002). Početna je denaturacija trajala 2 minuta na 95 °C, te je provedeno 20 ciklusa umnožavanja pri ovim uvjetima: 30 s na 95 °C, 30 s na 58 °C i 30 s na 72 °C; završno produljivanje trajalo je 10 minuta na 72 °C.

Detekcija VHSV i IHNV rađena je primjenom specifičnih početnica za sljedove gena G iz ovih dvaju virusa (prema Bruchhof i sur., 1995, te Miller i sur., 1998).

U reakcijama reverzne transkripcije upotrijebljeno je 15 pmol početnica VG1 (specifičnih za virus VHS) i IG1 (specifičnih za virus IHN), Tablica 1.

Pet μ l od cDNA dobivene u reakciji reverzne transkripcije umnoženo je u reakcijskom puferu s 2,5 mM MgCl₂ i 15 pmol početnica VG1/VD3 (za virus VHS) i IG1/ID3 (za virus IHN), Tablica 1. PCR reakcija tekla je prema ovom

Tablica 1. Nukleotidni sljedovi početnica rabljenih u RT-PCR reakcijama.
Table 1. Nucleotide sequences of primers used in RT-PCR reactions.

POČETNICA	NUKLEOTIDNI SLIJED
VG1	5'-ATGGAATGGAACACTTTTTTC-3'
IG1	5'-ATGATCACCCTCCGCTCAAT-3'
VD3	5'-TGTGATCATGGGTCCTGGTG-3'
VD5	5'-TCCCGCTATCAGTCACCAG-3'
ID3	5'-GATTGGAGATTTTATCAACA-3'
ID4	5'-CTCTGGACAAGCTCTCCAAGG-3'

programu: početna denaturacija 1 minuta na 95 °C, nakon čega je slijedilo 40 ciklusa: 30 s na 95 °C, 40 s na 52 °C i 40 s na 72 °C; završno produljivanje trajalo je 10 minuta na 72 °C. Duljina očekivanih produkata bila je 697 pb (VG1/VD3) i 682 pb (IG1/ID3).

Dva µl dobivenih produkata prve reakcije PCR upotrijebljeni su kao kalup za drugu »semi-nested« reakciju PCR s početnicama VD5/VD3 (za virus VHS) i ID4/ID3 (za virus IHN), Tablica 1. Program reakcije PCR uključivao je ove korake: početna denaturacija trajala je 1 minutu pri 95 °C, a slijedilo je 25 ciklusa umnožavanja pri sljedećim uvjetima: 30 s na 93 °C, 40 s na 52 °C, 40 s na 72 °C. Očekivana duljina regije umnožene s VD5/VD3 početnicama iznosi 444 pb, odnosno ID4/ID3 je 549 pb.

Istodobno je napravljen multipleks PCR koji služi za detekciju i VHSV i IHNV u jednoj reakcijskoj tubi. Rabljena cDNA prepisana je iz RNA koja je izolirana iz tkiva fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin s početnicama VG1 i ID4. U multipleks PCR reakciji upotrebljavane su početnice VG1, VD3, ID4 i ID3, Tablica 1.

Kao pozitivna kontrola rabljen je skupni uzorak (jetra, slezena, srce, bubreg, mozak) svježega tkiva iz kalifornijske pastrve dobivene iz bazena s ribama zaraženima virusom VHS, odnosno virusom IHN. Kao slijepa kontrola izvedene su RT-PCR reakcije uz dodatak svih komponenti, ali je umjesto kalupa upotrijebljena voda (Molecular Biology Grade Water).

Sve reakcije RT-PCR izvršene su na Mastercycler Personal, Eppendorf.

Gel-elektroforeza PCR produkata

PCR produkti analizirani su na 1,7%-tnom agaroznom gelu prethodno obojenom etidij-bromidom (0,5 g/ml). Za identifikaciju veličine PCR produkata upotrijebljen je molekularni marker 100 pb (TaKaRa). Rezultati su analizirani i dokumentirani kako je opisano i za gel-elektroforezu RNA.

REZULTATI

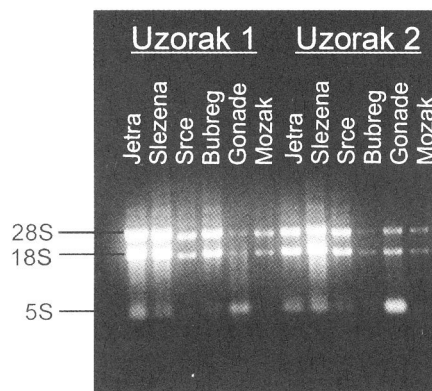
Rezultati općega kliničkog i patološkog pregleda

Općom kliničkom pretragom i patološkoanatomskim pregledom kalifornijskih pastrva nisu utvrđene promjene koje bi upućivale na zarazu VHS i IHN virusima. U literaturi su opisani slučajevi zaraze navedenim virusima, pri čemu jedinke nisu očitovale vidljive znakove bolesti (Miller i sur., 1998; Mortensen i sur., 1999), pa je naš cilj bio provjeriti prisutnost VHS i IHN virusa u ovim ribama bez obzira na izostajanje anamnestičkih, kliničkih i patološkoanatomskih znakova bolesti.

Izolacija RNA

Kvaliteta izolirane RNA provjeravana je elektroforetskom analizom na 1%-tnom agaroznom gelu obojenom etidij-bromidom. U slučaju elektroforeze RNA izolirane iz svježeg i smrznutog tkiva kalifornijskih pastrva izravno s pomoću Tri reagensa (Slike 1 i 2) vidljive su izrazito jasne vrpce koje potječu od 28S i 18S rRNA, koja je najzastupljenija RNA u stani. To su pokazatelji dobre izolacije ukupne RNA. U svim analizama prikazani su rezultati za tkiva dobivena iz po dvije različite kalifornijske pastrve.

Za razliku od RNA izolirane iz svježeg i smrznutog tkiva, RNA izolirana iz fiksiranog tkiva nema jasno odvojenih vrpce koje potječu od 28S i 18S RNA (Slike 3 i 4). To upućuje na priličnu degradaciju ukupne RNA, što je vjerojatno posljedica postupka fiksacije tkiva u metakarnu i formalinu i uklapanja u parafin.



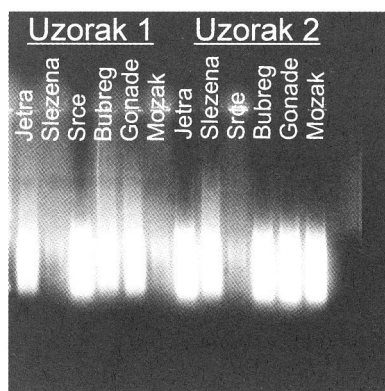
Slika 1. Elektroforetska analiza uzoraka RNA izoliranih iz svježega tkiva (jetra, slezena, srce, bubreg, gonade, mozak) iz dviju kalifornijskih pastrva (uzorak 1 i 2).

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from fresh tissue (liver, spleen, heart, kidney, gonads, brain) from two rainbow trouts (sample 1 and 2).



Slika 2. Elektroforetska analiza uzoraka RNA izoliranih iz smrznutoga tkiva (jetra, slezena, srce, bubreg, gonade, mozak) iz dviju kalifornijskih pastrva (uzorak 1 i 2).

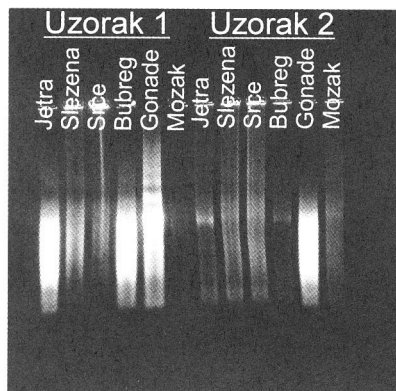
Figure 2. Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from frozen tissue (liver, spleen, heart, kidney, gonads, brain) from two rainbow trouts (sample 1 and 2).



Slika 3. Elektroforetska analiza uzoraka RNA izoliranih iz tkiva fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin (jetra, slezena, srce, bubreg, gonade, mozak) iz dviju kalifornijskih pastrva (uzorak 1 i 2).

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from methacarn-fixed and paraffin-embedded tissue (liver, spleen, heart, kidney, gonads, brain) from two rainbow trouts (sample 1 and 2).

Spektrofotometrijska analiza pokazala je da je količina izolirane RNA iz svježega tkiva bila oko 2,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, iz smrznutoga tkiva oko 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, iz tkiva fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin oko 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (jedan uzorak čak 9,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), a iz tkiva fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin ispod 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.



Slika 4. Elektroforetska analiza uzoraka RNA izoliranih iz tkiva fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin (jetra, slezena, srce, bubreg, gonade, mozak) iz dviju kalifornijskih pastrva (uzorak 1 i 2)

Figure 4. Agarose gel electrophoresis of total RNA isolated from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue (liver, spleen, heart, kidney, gonads, brain) from two rainbow trouts (sample 1 and 2).

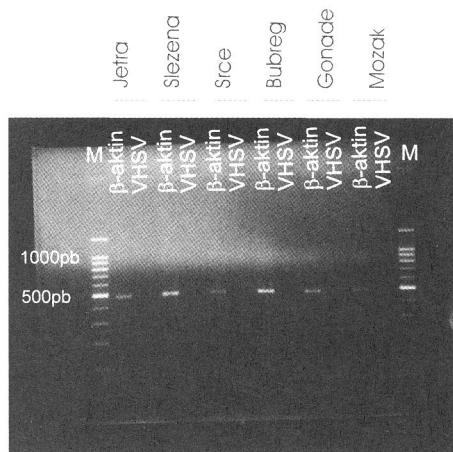
Reverzna transkripcija-lančana reakcija polimerazom (RT-PCR)

Da bismo provjerili integritet i kvalitetu RNA, izveden je RT-PCR. U reakciji reverzne transkripcije upotrijebljene su nespecifične, heksanukleotidne početnice, a dobivena cDNA je provjerena u lančanoj reakciji polimerazom s početnicama za gen očitovan u svim stanicama (β -aktin). U slučaju svježeg i smrznutog tkiva kalifornijskih pastrva dobiveni su očekivani produkti duljine 477 pb (Slika 5 i 6, stupci označeni kao β -aktin).

Dobar rezultat dobili smo i za tkivo fiksirano u metakarnu i uklopljeno u parafin (Slika 7). Produkt RT-PCR reakcije s početnicama za β -aktin nismo dobili iz tkiva fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin (rezultati nisu prikazani).

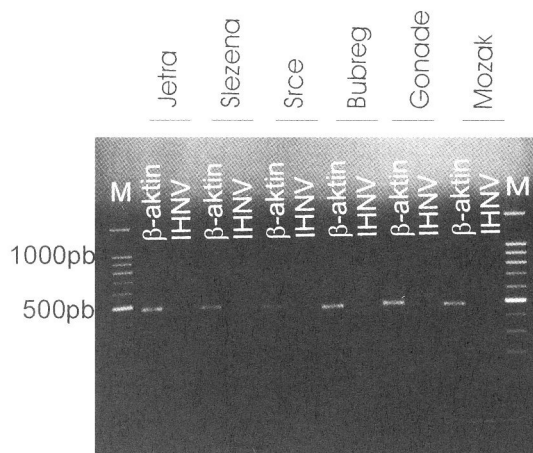
Za provjeru prisutnosti VHS i IHN virusa rađen je RT-PCR s početnicama specifičnima za te viruse. U reakciji reverzne transkripcije rabljene su VG1 i IG1 početnice, a nakon »semi-nested« PCR reakcije nisu dobiveni produkti očekivane veličine (za VHSV = 443 pb, i za IHNV = 548 pb), Slike 5 i 6. Multiplex PCR u kojem su uporabljene početnice VG1/VD3 za VHSV i ID4/ID3 za IHNV u jednoj reakcijskoj tubici također nije dao produkte (za VHSV = 697 pb i za IHNV = 548 pb), Slika 7, stupci označeni kao multipleks, ali su bili prisutni slabo vidljivi nespecifični produkti znatno manje veličine.

Reakcije RT-PCR s pozitivnim kontrolama (vidi Materijale i metode) dale su očekivane produkte (rezultati nisu prikazani). Reakcije sa slijepim kontrolama bile su negativne.



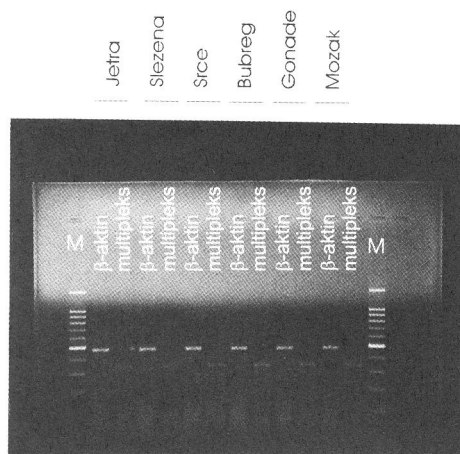
Slika 5. Elektroforetska analiza produkata RT-PCR umnoženih s početnicama za β -aktin i VHSV za svako pojedinačno suže tkivo (jetra, slezena, srce, bubreg, gonade, mozak) iz dviju kalifornijskih pastrva (uzorak 1 i 2). M — molekularni marker.

Figure 5. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified with primers for β -actin and VHSV for every particular fresh tissue (liver, spleen, heart, kidney, gonads, brain) from two rainbow trouts (sample 1 and 2). M — molecular marker.



Slika 6. Elektroforetska analiza produkata RT-PCR umnoženih s početnicama za β -aktin i IHNV za svako pojedinačno smrznuto tkivo (jetra, slezena, srce, bubreg, gonade, mozak) iz dviju kalifornijskih pastrva (uzorak 1 i 2). M — molekularni marker.

Figure 6. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified with primers for β -actin and IHNV for every particular frozen tissue (liver, spleen, heart, kidney, gonads, brain) from two rainbow trouts (sample 1 and 2). M — molecular marker.



Slika 7. Elektroforetska analiza produkata RT-PCR umnoženih s početnicama za β -aktin i višestruki (multipleks) PCR za svako pojedinačno tkivo (jetra, slezena, srce, bubreg, gonade, mozak) fiksirano u metakarnu i uklopljeno u parafin iz dviju kalifornijskih pastrva (uzorak 1 i 2). M — molekularni marker. Figure 7. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified with primers for β -actin and multiplex PCR for every particular tissue (liver, spleen, heart, kidney, gonads, brain) fixed in methacarn and embedded in paraffin from two rainbow trouts (sample 1 and 2). M — molecular marker.

RASPRAVA

Razvoj akvakulturne djelatnosti uvodi potrebu za primjenom brzih dijagnostičkih metoda za identifikaciju ribljih bolesti, poglavito virusa koji u uzgojenim populacijama riba izazivaju velike štete. Ovakve se metode temelje na detekciji patogenog genoma, tj. DNA, RNA ili određenog dijela ovih molekula, što ih čini vrlo preciznim (može se odrediti i odgovarajući soj). Iako se danas izolacije DNA i RNA obavljaju rutinski iz svježega i smrznutoga tkiva, postoje velike potrebe za pronalaženjem metode koja bi kao početni materijal za izolaciju RNA rabila fiksirano tkivo uklopljeno u parafin. Prednost takvoga tkiva jest što se može čuvati desetcima godina bez posebnih uvjeta za pohranjivanje (Coombs i sur., 1999), te je uvijek dostupno za obradu i usporedbu s drugim uzorcima (Beaulieux i sur., 2003).

Naš je zadatak bio utvrditi najbolji polazni materijal između svježega tkiva, smrznutoga tkiva, tkiva fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin (starog mjesec dana) i tkiva fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin (starog mjesec dana) za daljnju analizu RT-PCR-om. Pritom su izolacije izvodene iz 6 različitih organa uzgojene kalifornijske pastrve *Oncorhynchus mykiss* — jetre, slezene, srca, bubrega, gonada i mozga, koji se rabe kao početni materijal i za ispitivanje prisutnosti patogena i za mnoga genetička istraživanja.

RNA izolirane iz svježeg i smrznutog tkiva spomenutih organa pokazale su zadovoljavajuću kvalitetu i integritet, što je dokazano elektroforezom na 1 % agaroznom, nedenaturirajućem gelu i u reakciji RT-PCR s početnicama za β -aktin. Ako je ovakvo tkivo dostupno za rad u laboratoriju, to je materijal koji treba preferirati.

RNA izolirana iz tkiva fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin bila je znatno degradirana (Slika 4) i u suglasnosti s literaturnim podacima (Koopmans i sur., 1993) nije bila izolirana u velikoj količini (potvrđeno spektrofotometrijskim mjerenjem koncentracije). Ni dvostruko veća količina ove RNA u reakciji reverzne transkripcije i cDNA u reakciji PCR nije dala umnoženi, željeni produkt duljine 477 pb, što potvrđuje prethodno objavljene rezultate prema kojima iz ovakve RNA nije moguće dobiti PCR produkte dulje od 200 do 300 pb (Lewis i sur., 2001).

Zato je naš zadatak bio ispitati mogućnost upotrebe drugog fiksatora — metakarna, kojim su Shibutani i suradnici (2000) fiksirali stanice štakora i iz njih uspješno izolirali RNA, te je upotrijebili za dobivanje RT-PCR produkata duljine 300–700 pb.

RNA izolirana iz tkiva fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin pokazala je veliku degradiranost, što je vidljivo nakon gel-elektroforeze (Slika 3). Spektrofotometrijskim mjerenjem provjerena je količina RNA. Naša je pretpostavka da, s obzirom na uspješno umnožavanje dijela gena za β -aktin duljine 477 pb, ovakva RNA može poslužiti kao početni materijal za daljnu RT-PCR analizu produkata duljine 477 pb ili kraćih od toga. Sljedeći korak u našim istraživanjima bit će pokušaj umnožavanja dijela specifičnog gena približne duljine kao i β -aktin, a koji nema toliko jaku eksprimiranost.

Prema podacima u dostupnoj literaturi, ovo je prva uspješna izolacija RNA iz tkiva riba fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin.

VHSV i IHNV virusi nisu detektirani u već spomenutim tkivima kalifornijskih pastrva koje su uzete za rutinski pregled s nezaraženog ribogojilišta, bilo da je riječ o svježem, smrznutom ili fiksiranom i uklopljenom tkivu. Bilo bi zanimljivo istražiti je li iz tkiva fiksiranog u metakarnu i uklopljenog u parafin kod zaraženih riba moguće dobiti produkte reakcije RT-PCR dulje od 477 pb (odnosno 697 i 682 pb), što u ovom radu nismo mogli provjeriti jer su jedinke bile nezaražene.

Fiksirano i uklopljeno tkivo nudi zanimljive mogućnosti kao početni materijal u njegovim daljnjim analizama i naša će buduća istraživanja pokazati je li i nakon duljega vremena nakon uklapanja tkiva ovakav materijal pogodan za izolaciju RNA koju zatim možemo upotrijebiti u reakciji RT-PCR.

Summary

COMPARISON OF THE QUALITY OF RNA ISOLATED FROM THE RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) TISSUE IN FOUR DIFFERENT WAYS

I. Vardić, E. Teskeredžić

Rapid and accurate diagnostic procedures for identification of reared fish diseases are important in order to reduce serious losses in relation of diseases outbreaks. Therefore, molecular biology methods are required for such types of investigations. First level in these experiments are DNA or RNA isolation. Tissue preparation for isolation of RNA, which is used in further RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) analysis is the key step on which is the whole process of analysis dependent. Our goal was to compare quality and integrity of RNA isolated from the rainbow trout tissue, which was prepared in four different ways: fresh tissue, frozen tissue, in formallin-fixed, paraffin embedded tissue as well as in methacarn-fixed, paraffin embedded tissue. Isolated RNA was analyzed in gel electrophoresis on non-denaturated, 1% agarose gel. Quality and integrity of RNA was proved by RT-PCR reaction with primers for β -actin gene. Additional, prepared tissue was tested on presence of two fish viruses: viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus and infectious haematopoietic necrosis (IHN) virus in RT-PCR reaction with primers specific for these viruses. RNA isolated from fresh and frozen tissue was of high quality, integrity and quantity. RNA isolated from in methacarn-fixed, paraffin embedded tissue was quite disintegrated, but in RT-PCR with primers for β -actin gave expected products. These products were absent after RT-PCR reaction with in formallin-fixed, paraffin-embedded tissue. That agrees with the facts from the literature about very aggressive affect of formalin as a fixative on RNA in tissue. Inspected fish were not infected with VHS and IHN viruses and that was in agreement with results of clinical examination and pathological analysis. According to our knowledge, this is the first successful RNA isolation from in methacarn-fixed, paraffin embedded fish tissue. Isolated RNA can be used for further analysis in RT-PCR reaction. This method is simple, relatively cheap, and tissue embedded in paraffin can be stored for years. Such tissue could be used for pathogen (virus) detection as well as for gene expression analysis on RNA level, what will be the goal of our future investigations.

Key words: *rainbow trout, methacarn, RNA isolation, RT-PCR, VHSV, IHN*

Irena Vardić, B. Sc., dr. sc. Emin Teskeredžić, senior scientist, Ruder Bošković Institute, Center for marine and environmental research, Laboratory for aquaculture, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia, e-mail: ivardic@irb.hr

LITERATURA

- Beaulieux, F., Berger, M. M., Tchong, R., Giraud, P., Lina, B. (2003):* RNA extraction and RT-PCR procedures adapted for the detection of enterovirus sequences from frozen and paraffin embedded formalin-fixed spinal cord samples. *J. Virol. Methods.*, 107, 115 — 120.
- Bergmann, S. M., Fichtner, D., Skall, H. F., Schlotfeldt, H.-J., Olesen, N. J. (2003):* Age— and weight— dependent susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) of varying virulence. *Dis. Aquat. Org.*, 55, 205 — 210.
- Bruchhoff, B., Marquardt, O., Enzmann, P.-J. (1995):* Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.*, 55, 111 — 119.
- Chomzynski, P., Sacchi, N. (1987):* Single step method of RNA isolation by acidic guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anl. Biochemistry*, 162, 156 — 159.
- Coombs, N. J., Gough, A. C., Primrose, J. N. (1999):* Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucl. Acid. Res.*, 27, (16), e12.
- Einer-Jensen, K., Björklund, S., Oreshkova, S., Shchelkunov, I., Vesely, T., Lorenzen, N. (2002):* Detection and typing of fish viruses. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22, (2), 158 — 165.
- EireStat (2001):* Aquaculture production. Central Statistics Office, Corc, Ireland.
- Isshiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T., Miyazaki, T. (2001):* An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, 47, 87 — 99.
- Jung, K., Kim, J., Kim, O., Kim, B., Chae, C. (2003):* Differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by multiplex RT-nested PCR and comparison with in situ hybridization. *J. Virol. Methods*, 108, 41 — 47.
- Koopmans, M., Monroe, S. S., Coffield, L. M., Zaki, S. R. (1993):* Optimisation of extraction and PCR amplification of RNA extracts from paraffin-embedded tissue in different fixative. *J. Virol. Methods*, 43, 189 — 204.
- Lewis, F., Maughan, N. J., Smith, V., Hillan, K., Quirke, P. (2001):* Unlocking the archive — gene expression in paraffin-embedded tissue. *J. Pathol.*, 195, 66 — 71.
- Körbler, T., Gršković, M., Dominis, M., Antica, M. (2003):* A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and in paraffin-embedded lymphatic tissues. *Exp. Mol. Pathol.*, 74, 336 — 340.
- Masuda, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M., Okubo, K. (1999):* Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimisation of molecular biology application for such samples. *Nucleic Acids Res.*, 27, (22), 4436 — 4443.
- Miller, T. A., Rap, J., Wastlhuber, U., Hoffmann, R. W., Enzmann, P.-J. (1998):* Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based

- detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells. *Dis Aquat Org.*, 34, (1), 13 — 20.
- Mortensen, H. F., Heuer, O. E., Lorenzen, N., Otte, L., Olesen, N. J. (1999):* Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. *Virus Res.*, 63, 95 — 106.
- Sambrook, J., Russell, D. W., Sambrook, J. (2001):* Molecular cloning: A laboratory manual (3-volume set). Editor. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Shibutani, M., Uneyama, C., Miyazaki, K., Toyoda, K., Hirose, M. (2000):* Methacarn fixation: a novel tool for analysis of gene expressions in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab Invest.*, 80, (2), 199 — 208.
- Rupp, G. M., Locker, J. (1988):* Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques*, 6, (1), 56 — 60.
- Valle, L. D., Lunardi, L., Colombo, L., Belvedere, P. (2002):* European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organisation. *J. Steroid. Biochem.*, 80, 25 — 34.
- Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J. T., Nicholson, B. L. (1999):* Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 37, (12), 4139 — 4141.
- Winton, J. R., Einer-Jensen, K. (2002):* Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus, pp. 49 — 79. In: Cunningham, C. O. (ed.) *Molecular diagnosis of salmonid diseases*. Kluwer academic publishers, Netherlands. 364pp.
- Woo, P. T. K., Bruno, D. W. (1999):* Fish diseases and disorders (3 — volume set). Editor. First edition. Cabi publishing, Cab International.

Primljeno: 2. 2. 2004.

Prihvaćeno: 23. 2. 2004.