

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2013-370

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.05.2013**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **03.12.2014**
(Věstník č. 49/2014)

(71) Přihlašovatel:
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha 6 -
Ruzyně, CZ

(72) Původce:
Ing. Jana Jarošová, Broumov, CZ
Mgr. Tomáš Dráb, Žatec, CZ
Ing. Eva Svobodová, Plzeň, CZ
Ing. Jiban Kumar, Ph.D., Buštěhrad, CZ

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Specifické genové sekvence jednotlivých
oligo-prób pro rodově specifickou detekci
virů obilnin a trav pomocí technologie
Microarray**

(57) Anotace:
Řešení popisuje oligonukleotidové sondy, které mají
specifické genové sekvence a lze je použít pro rodově
specifickou detekci virů obilnin a trav pomocí
technologie Microarray.

CZ 2013 - 370 A3

Specifické genové sekvence jednotlivých oligo-prób pro rodově specifickou detekci virů obilnin a trav pomocí technologie Microarray

Oblast techniky

Řešení popisuje specifické genové sekvence určené pro určení osmi různých rodů virů obilnin a trav pomocí techniky Microarray čip, kdy dochází k hybridizaci nukleových kyselin (RNA/DNA) virů na specifické sondy připevněné na čip. Během jedné reakce je tedy možno zjistit přítomnost více rodů virových patogenů najednou a následně identifikovat jejich druhové zastoupení včetně nálezů virových patogenů nových či nově zavlečených.

Dosavadní stav techniky

Virózy rostlin jsou doposud neléčitelné a zejména u hospodářsky důležitých plodin, jakými obilniny jsou, dokážou způsobit obrovské ztráty na výnosech. Umělé rozšíření druhů *Poaceae* v ekosystémech, často ve velmi rozsáhlých oblastech, společně s rychlými změnami kultivačních metod, neodvratně přineslo proměny rovnováhy rostlina/patogenní organismus. *Poaceae* tak hostí mnoho patogenních organismů včetně více jak 100 druhů virů (Lapierre a Signoret, 2004). Téměř 20 % veškerých známých rostlinných virů je schopno napadat *Poaceae* (Brunt et al., 1996).

Běžně využívané detekční techniky, ať už založené na nukleových kyselinách nebo na bílkovinách, mají svá omezení, přičemž největším je nutnost presumpce znalosti identity viru ve vzorku, a tudíž neschopnost detekovat viry nové, neznámé, nebo u daného vzorku nepředpokládané (Grover et al., 2010). Pokud toto vše vezmeme v potaz, východiskem rostlinných virologů jsou metody schopné detekce širokého počtu různých virů, často včetně takových, které doposud nebyly s danou oblastí nebo podmínkami spojovány (Boonham et al., 2007). Rutinně se bohužel v ČR i

celosvětově obecně testuje pouze na několik nejdůležitějších a nejběžněji se vyskytujících virů, což je nedostačující.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňují specifické genové sekvence jednotlivých oligo-prób pro rodově specifickou detekci virů obilnin a trav pomocí technologie Microarray, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že diagnostika virů obilnin je prováděna sondami o následujících sekvencích

Sonda	Virus	Sekvence
Bymo-univ-1	Bymovirus	AAGACAACCAAYCRCAGGGTTCTGG
Bymo-univ-2	Bymovirus	CAAGCTTGCGCCATTGGTGTGGCACA WGCAA
Bymo-univ-3	Bymovirus	ACCACTGAAACCCGAMGGCGCAA
Bymo-univ-1rc	Bymovirus	CCAGAACCCTGYGRTTGGTTGTCTT
Bymo-univ-2rc	Bymovirus	TTGCWTGTGCCAACACCAATGGCRGCAA GCTTG
Bymo-univ-3rc	Bymovirus	TTGCGCCKTCGGGTTTCAGTGGT
Fiji-univ-1	Fijivirus	DGATGTTCAARTTATTGGTAATAAAKG
Fiji-univ-1rc	Fijivirus	CMTTATTACCAATAAYTTGAACATCH
Furo-univ-1	Furovirus	AAATGACGGTTTGGGTCTGAAGTWTGA
Furo-univ-1rc	Furovirus	TCAWACTTCGACCCAAACCGTCATTT
Luteo-univ-1	Luteovirus	GGKTTTTTAGAGGGGCTCTGTWCCGMC TCTGGTTTTGA
Luteo-univ-2	Luteovirus	TGGAATACTTAAGKCCTACCAT
Luteo-univ-1rc	Luteovirus	TCAAACCAGAGKCGGWACAGAGCCCC TCTAAAAMCC
Luteo-univ-2rc	Luteovirus	ATGGTAGGMCTTAAGTATTCCA
Marafi-univ-1	Marafivirus	CCTGGAAAGCTTGCCAGACCCTCGCTCT CATGCACGATG
Marafi-univ-2	Marafivirus	TMGCTWCAGGGTGAATTGCTTCAB
Marafi-univ-1rc	Marafivirus	CATCGTGCATGAGAGCGAGGGTCTGGC AAGCTTTCCAGG
Marafi-univ-2rc	Marafivirus	VTGAAGCAATTCACCCTGWAGCKA
Mastre-univ-1	Mastrevirus	GGAGTCATDTCCTTSAKCCA

Mastre-univ-1rc	Mastrevirus	TGGMTSAAGGAHATGACTCC
Rymo-univ-1	Rymovirus	TTGGCTSCTBGAGCAAGAACCATACAAG WSC
Rymo-univ-2	Rymovirus	CGTATGCTTTTCGACTTCTATGAAATAACW TCCGMA
Rymo-univ-1rc	Rymovirus	GSWCTTGTATGGTTCTTGCTCVAGSAGC CAA
Rymo-univ-2rc	Rymovirus	TKCGGAWGTTATTTTCATAGAAGTCGAAA GCATACG
Tritimo-univ-1	Tritimovirus	GTGAGCTCTCGCATAGAGATAAGC
Tritimo-univ-2	Tritimovirus	CAGGWAGCATTTTCTGGTCAA
Tritimo-univ-1rc	Tritimovirus	GCTTATCTCTATGCGAGAGCTCAC
Tritimo-univ-2rc	Tritimovirus	TTGACCAGAAAATGCTWCCTG

Specifické genové sekvence podle vynálezu jsou určeny pro stanovení osmi rodů virů obilnin pomocí techniky Microarray čip, kdy nukleové kyseliny virů hybridizují na specifické sondy připevněné na čip.

Reakční směs obsahuje vzorek testované nukleové kyseliny připravené k hybridizaci následujícím způsobem. RNA se izoluje z rostlin pomocí Spectrum Plant Total RNA kitu (Sigma) dle manuálu výrobce. V dalším kroku se RNA přepíše pomocí M-MLV reversní transkriptázy do cDNA za použití aminoallyl-dUTP. V dalším kroku se dosyntetizuje druhé vlákno cDNA pomocí Klenowova fragmentu. Připravená dvouvláknenná cDNA se izoluje pomocí PureLink PCR Purification Kitu (Invitrogen) a následně přečistí a zakoncentruje pomocí etanolové precipitace.

Takto získaná cDNA se smíchá s barvou Alexa Fluoro 647 Carboxylic Acid, obarvená cDNA se rozpustí v 8 µl H₂O a efektivita navázání barvy se ověří pomocí spektroskopu Nanodrop 2000 (Thermosience). Tato směs je nanášena na sklo obsahující specifické sondy určené k detekci jednotlivých virů. Seznam sond a jejich sekvence jsou uvedeny v následující Tabulce 1.

Proběhla hybridizace a následně čtečka k tomu určená přečetla intenzitu signálu a tím určila přítomnost nukleové kyseliny virů a stanovila jeho rod.

Specifické genové sekvence podle vynálezu umožňují simultánní stanovení osmi rodů obilných virů, což má obrovský význam při šlechtění a pěstování obilnin. Takto rozsáhlých a přesných výsledků nebylo dosud dosahováno.

Zde uváděné sondy jsou řešeny tak, aby byly schopny detekovat celý rod viru a tudíž jsou schopny zachytit i viry nové či neznámé, neboť s vysokou pravděpodobností budou jejich sekvence nukleové kyseliny v oněch konzervativních oblastech, v nichž byly sondy navrženy, hodně obdobné či identické. Takového řešení doposud nebylo u obilných virů dosaženo.

Následující příklad provedení vynález pouze dokládá, aniž by jej jakkoliv omezoval.

Příklad provedení

Příklad 1

Vyhodnocení zdravotního stavu vzorků obilnin z polí.

Pro analýzu zdravotního stavu porostu ozimé pšenice symptomaticky odpovídající viróznímu stavu byly z pozemků odebrány symptomatické vzorky listů pšenice. RNA byla izolována z rostlin pomocí Spectrum Plant Total RNA kitu (Sigma) dle manuálu výrobce. V dalším kroku byla RNA přepsána pomocí M-MLV reversní transkriptázy do cDNA za použití aminoallyl-dUTP. V dalším kroku bylo dosyntetizováno druhé vlákno cDNA pomocí Klenowova fragmentu. Připravená dvouvláknenná cDNA byla izolována pomocí PureLink PCR Purification Kitu (Invitrogen) a následně přečištěna a zakoncentrována pomocí etanolové precipitace.

Takto získaná cDNA byla smíchána s barvou Alexa Fluoro 647 Carboxylic Acid, obarvená cDNA byla rozpuštěna v 8 μ l H₂O a efektivita navázání barvy byla ověřena pomocí spektroskopu Nanodrop 2000

(Thermoscience). Připravené vzorky byly hybridizovány na čip obsahující následující sondy:

<i>Sonda</i>	<i>Virus</i>	<i>Sekvence</i>
Bymo-univ-1	Bymovirus	AAGACAACCAAYCRCAGGGTTCTGG
Bymo-univ-2	Bymovirus	CAAGCTTGCGCCATTGGTGTGGCACA WGCAA
Bymo-univ-3	Bymovirus	ACCACTGAAACCCGAMGGCGCAA
Bymo-univ-1rc	Bymovirus	CCAGAACCCTGYGRTTGGTTGTCTT
Bymo-univ-2rc	Bymovirus	TTGCWTGTGCCAACACCAATGGCRGCAA GCTTG
Bymo-univ-3rc	Bymovirus	TTGCGCCKTCGGGTTTCAGTGGT
Fiji-univ-1	Fijivirus	DGATGTTCAARTTATTGGTAATAAAKG
Fiji-univ-1rc	Fijivirus	CMTTATTACCAATAAYTTGAACATCH
Furo-univ-1	Furovirus	AAATGACGGTTTGGGTCTGAAGTWTGA
Furo-univ-1rc	Furovirus	TCAWACTTCGACCCAAACCGTCATTT
Luteo-univ-1	Luteovirus	GGKTTTTTAGAGGGGCTCTGTWCCGMC TCTGGTTTTGA
Luteo-univ-2	Luteovirus	TGGAATACTTAAGKCCTACCAT
Luteo-univ-1rc	Luteovirus	TCAAACCAGAGKCGGWACAGAGCCCC TCTAAAAAMCC
Luteo-univ-2rc	Luteovirus	ATGGTAGGMCTTAAGTATTCCA
Marafi-univ-1	Marafivirus	CCTGGAAAGCTTGCCAGACCCTCGCTCT CATGCACGATG
Marafi-univ-2	Marafivirus	TMGCTWCAGGGTGAATTGCTTCAB
Marafi-univ-1rc	Marafivirus	CATCGTGCATGAGAGCGAGGGTCTGGC AAGCTTTCCAGG
Marafi-univ-2rc	Marafivirus	VTGAAGCAATTACCCCTGWAGCKA
Mastre-univ-1	Mastrevirus	GGAGTCATDTCCTTSAKCCA
Mastre-univ-1rc	Mastrevirus	TGGMTSAAGGAHATGACTCC
Rymo-univ-1	Rymovirus	TTGGCTSCTBGAGCAAGAACCATACAAG WSC
Rymo-univ-2	Rymovirus	CGTATGCTTTCGACTTCTATGAAATAACW TCCGMA
Rymo-univ-1rc	Rymovirus	GSWCTTGTATGGTTCTTGCTCVAGSAGC CAA
Rymo-univ-2rc	Rymovirus	TKCGGAWGTTATTTTCATAGAAGTCGAAA GCATACG

Tritimo-univ-1	Tritimovirus	GTGAGCTCTCGCATAGAGATAAGC
Tritimo-univ-2	Tritimovirus	CAGGWAGCATTTTCTGGTCAA
Tritimo-univ-1rc	Tritimovirus	GCTTATCTCTATGCGAGAGCTCAC
Tritimo-univ-2rc	Tritimovirus	TTGACCAGAAAATGCTWCCTG

Výsledky hybridizace byly analyzovány v čtečce k tomu určené. V rostlinách byl identifikován virus rodu Luteovirus a současně proběhly analýzy určující jeho druh a kmen. Takto lze testovat jak materiál na šlechtitelských stanicích, tak rostliny z polních odběrů nebo laboratorní izoláty. Protože infekci viry nelze nijak léčit, je jedinou ochranou proti virovým chorobám obilnin použití rezistentních odrůd a včasná diagnostika.

Účinnost specifických genových sekvencí podle vynálezu byla úspěšně ověřena původci ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., Praha, CZ.

Průmyslová využitelnost

Microarray čipy se specifickými genovými sekvencemi určenými pro diagnostiku virů obilnin je možno dodávat laboratořím zabývajícím se detekcí rostlinných patogenů jako detekční kit k okamžitému použití (ready - to use), kdy uživateli postačí pouze připravit svůj vzorek testované RNA a provést reakci dle přesně stanovených podmínek. Lze tak hned v počátku odhalit nemocné rostliny a zabránit jejich epidemickým výskytům.

Použitá literatura

Boonham N., Tomlinson J., a. Mumford R. 2007. Microarrays for Rapid Identification of Plant Viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 45, 307–28.

Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibb A.J., Watson L. a Zurcher E.J. 1996. Plant viruses online: descriptions and lists from the VIDE Database, Version 20.

Grover V., Piercea M. L., Hoyta P., Zhanga F., Melchera U. 2010. Oligonucleotide-based microarray for detection of plant viruses employing sequence-independent amplification of targets. J. Virol. Methods, 163: 57-67.

Lapierre H., Signoret P.A. (Ed): Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae). INRA edition, Paris, France, pp 453- 455.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Specifické genové sekvence jednotlivých oligo-prób pro rodově specifickou detekci virů obilnin a trav pomocí technologie Microarray, **vyznačující se tím**, že diagnostika virů obilnin je prováděna sondami o následujících sekvencích

Sonda	Virus	Sekvence
Bymo-univ-1	Bymovirus	AAGACAACCAAYCRCAGGGTTCTGG
Bymo-univ-2	Bymovirus	CAAGCTTGCGCCATTGGTGTGTCACA WGCAA
Bymo-univ-3	Bymovirus	ACCACTGAAACCCGAMGGCGCAA
Bymo-univ-1rc	Bymovirus	CCAGAACCCTGYGRTTGGTTGTCTT
Bymo-univ-2rc	Bymovirus	TTGCWTGTGCCAACACCAATGGCRGCAA GCTTG
Bymo-univ-3rc	Bymovirus	TTGCGCCKTCGGGTTTCAGTGGT
Fiji-univ-1	Fijivirus	DGATGTTCAARTTATTGGTAATAAAGK
Fiji-univ-1rc	Fijivirus	CMTTATTACCAATAAYTTGAACATCH
Furo-univ-1	Furovirus	AAATGACGGTTTGGGTCGAAGTWTGA
Furo-univ-1rc	Furovirus	TCAWACTTCGACCCAAACCGTCATTT
Luteo-univ-1	Luteovirus	GGKTTTTTAGAGGGGCTCTGTWCCGMC TCTGGTTTTGA
Luteo-univ-2	Luteovirus	TGGAATACTTAAGKCCTACCAT
Luteo-univ-1rc	Luteovirus	TCAAACCAGAGKCGGWACAGAGCCCC TCTAAAAAMCC
Luteo-univ-2rc	Luteovirus	ATGGTAGGMCTTAAGTATTCCA
Marafi-univ-1	Marafivirus	CCTGGAAAGCTTGCCAGACCCTCGCTCT CATGCACGATG
Marafi-univ-2	Marafivirus	TMGCTWCAGGGTGAATTGCTTCAB
Marafi-univ-1rc	Marafivirus	CATCGTGATGAGAGCGAGGGTCTGGC AAGCTTTCCAGG
Marafi-univ-2rc	Marafivirus	VTGAAGCAATTCACCCTGWAGCKA
Mastre-univ-1	Mastrevirus	GGAGTCATDTCCTTSAKCCA
Mastre-univ-1rc	Mastrevirus	TGGMTSAAGGAHATGACTCC
Rymo-univ-1	Rymovirus	TTGGCTSCTBGAGCAAGAACCATACAAG WSC
Rymo-univ-2	Rymovirus	CGTATGCTTTCGACTTCTATGAAATAACW TCCGMA

Rymo-univ-1rc	Rymovirus	GSWCTTGTATGGTTCTTGCTCVAGSAGC CAA
Rymo-univ-2rc	Rymovirus	TKCGGAWGTTATTTTCATAGAAGTCGAAA GCATACG
Tritimo-univ-1	Tritimovirus	GTGAGCTCTCGCATAGAGATAAGC
Tritimo-univ-2	Tritimovirus	CAGGWAGCATTTTCTGGTCAA
Tritimo-univ-1rc	Tritimovirus	GCTTATCTCTATGCGAGAGCTCAC
Tritimo-univ-2rc	Tritimovirus	TTGACCAGAAAATGCTWCCTG