

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2013-345

(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: **13.05.2013**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **26.11.2014**
(Věstník č. 48/2014)

(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 molekulární detekci virových
patogenů obilnin a trav pomocí technologie
Microarray**

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

Specifické genové sekvence jednotlivých oligo-prób pro molekulární detekci virových patogenů obilnin a trav pomocí technologie Microarray

Oblast techniky

Řešení popisuje specifické genové sekvence určené pro diagnostiku virů obilnin a trav pomocí techniky Microarray čip, kdy dochází k hybridizaci nukleových kyselin (RNA/DNA) virových patogenů na specifické sondy připevněné na čip. Během jedné reakce je tedy možno zjistit přítomnost více virů najednou, včetně detekce na úrovni jejich kmenů.

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).

Do současnosti bylo vyvinuto a je každodenně využíváno mnoho metod (elektronová mikroskopie, ELISA, PCR, RT-PCR, TaqMan, reverse PAGE, hybridizace nukleových kyselin, metagenomické přístupy, biologické testy, (Boonham et al., 2003). Běžné metody nacházející uplatnění v rutinní diagnostice zahrnují různé variace polymerázové řetězové reakce (PCR), sérologických esejí jako enzyme linked immunosorbent assay ELISA, a dále imufluorescenční testy na protilátky (Melcher et al., 2008; Menzel et al., 2002; Webster et al., 2004). Tyto 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). Rutinně se tedy v ČR i celosvětově obecně testuje pouze na několik nejdůležitějších a nejběžněji se vyskytujících virů, což nebývá zcela přesné.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňují specifické genové sekvence jednotlivých oligo-prób pro molekulární detekci virových patogenů 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
BaYMV-1	BaYMV	TCACAACTGATGAGGCATGGATCGATGCCCTCA
BaYMV-2	BaYMV	ACAAGCATGCTGAGAATCAAGTAATGCAAA
BaYMV-1rc	BaYMV	TGAGGGCATCGATCCATGCCTCATCAGTTGTGA
BaYMV-2rc	BaYMV	TTTGCATTACTTGATTCTCAGCATGCTTGT
BSMV-3	BSMV	GGCATGGATGTTGTGAAGAAATTCGCCGTCATGT CAGT
BSMV-4	BSMV	ATCTTTGGTGAAACGGTTGCTACAGGAACAACCC C
BSMV-3rc	BSMV	ACTGACATGACGGCGAATTTCTTCACAACATCCA TGCC
BSMV-4rc	BSMV	GGGGTTGTTCTGTAGCAACCGTTTCACCAAAGA T
BYDV-spc-1	BYDV	GAGCAGGCGCTTAAGTGGGAACACGGGA

BYDV- spc-2	BYDV	GTGAATGAATTCAGTAGGCCGTAG
BYDV-1	BYDV	AAGTCCTACCACCGTTACAAGATCACAA
BYDV- spc-3	BYDV	CTGGGAATCATTCGGAGTTGACCCT
BYDV-2	BYDV	TCTTACGGTAAGTGCCCAACTCCA
BYDV- spc-1rc	BYDV	TCCCGTGTTCCCACTTAAGCGCCTGCTC
BYDV- spc-2rc	BYDV	CTACGGCCTACTGAATTCATTAC
BYDV-1rc	BYDV	TTGTGATCTTGTAACGGTGGTAGGACTT
BYDV- spc-3rc	BYDV	AGGGTCAACTCCGAATGATTCCCAG
BYDV-2rc	BYDV	TGGAGTTGGGCACTTACCGTAAGA
CoSV-1	CoSV	AAGATAACRTGTGGAGCTTGTCAGATCAG
CoSV-1rc	CoSV	CTGATCTTGACAAGCTCCACAYGTTATCTT
LLV-1	LLV	ATCGACCTYTTCTGCCAGTTCCACCCTAGYGTGG A
LLV-1rc	LLV	TCCACRCTAGGGTGGAACTGGCAGAAARAGGTCTG AT
MDMV-1	MDMV	GGGCTGARTTYGATAGATGGTATGARGCAGTRC AGAA
MDMV-3	MDMV	AACTTTCTTACACTGTGGCACGCGACATGAGAAC AACCAATTCA
MDMV-	MDMV	TTCTGYACTGCYTCATACCATCTATCRAAYTCAG

1rc		CCC
MDMV-3rc	MDMV	TGAATTGGTTGTTCTCATGTCGCGTGCCACAGTG TAAGAAAGTT
SBWMV-1	SBWMV	AAATGACGGTTTGGGTCTGAARTATGA
SBWMV-2	SBWMV	AGTTGACGGGAYGGCGTCTCGGR
SBWMV-1rc	SBWMV	TCATAYTTGACCCAAACCGTCATTT
SBWMV-2rc	SBWMV	YCCGAGACGCCRTCCCGTCAACT
SCSMV-1	SCSMV	AGTGGGTTTCAGTTCTCGGTTCTGTAGCGGGAAAC CCATAATACC
SCSMV-1rc	SCSMV	GGTATTATGGGTTTCCCGCTACGAACCGAGAACT GAACCCACT
SpMV-1	SpMV	GTCTATGTGACTTCCATCCGTAGTGTGGTTTCCA CGAAG
SpMV-1rc	SpMV	CTTCGTGGAAACCACACTACGGATGGAAGTCAC ATAGAC
WDV-1	WDV	GCATTGGGATTGGTGATGGAAGCACGAAGCTTG T
WDV-2	WDV	GCAGATGTGGTGATCCATCTTCGTGG
WDV-1rc	WDV	ACAAGCTTCGTGCTTCCATCACCAATCCCAATGC
WDV-2rc	WDV	CCACGAAGATGGATCACCACATCTGC
WDV-3	WDV	AGATGTTCATTTTTCCAGCTTTCAATGGTCTCATG

WDV-3rc	WDV	CATGAGACCATTGAAAGCTGGAAAAATGAACATC T
WSMV-1	WSMV	GCGAAGCCATCACTTCGAGCCATT
WSMV-2	WSMV	GGAGCTCGAGTGATGATCGAGGAGAGTGTTTC
WSMV-1rc	WSMV	AATGGCTCGAAGTGATGGCTTCGC
WSMV-2rc	WSMV	GAACACTCTCCTCGATCATCACTCGAGCTCC

Proběhne hybridizace a následně čtečka k tomu určená přečte intenzitu signálu a tím určí přítomnost viru.

Specifické genové sekvence podle vynálezu umožňují simultánní stanovení jedenácti obilných virů, což má obrovský význam při šlechtění a pěstování obilnin. Takto rozsáhlých výsledků nebylo dosud dosahováno, protože nově uváděné sondy je možné použít současně, na jednom čipu a tudíž otestovat vzorek na mnoho virů obilnin najednou, což podstatně zrychluje a zpřesňuje celé stanovení nežádoucích virů.

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

Příklady provedení

Příklad 1

Vyhodnocení zdravotního stavu šlechtitelského materiálu určeného pro experimentální hodnocení rezistence vůči jednomu viru v polních podmínkách.

Pro analýzu zdravotního stavu pokusného pozemku šlechtitelských linií ozimého ječmene šlechtěných na rezistenci vůči závažnému viru žluté zakrslosti ječmene na pozemku přihlašovatele, kterým je Výzkumný ústav

rostlinné výroby, v.v.i., Praha, CZ, jsou v listopadu z pokusných pozemků odebrány vzorky listů ječmene z jednotlivých testovaných variant. 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 (např. Alexa Fluoro 647 Carboxylic Acid), obarvená cDNA se rozpustí v 8 µl H₂O a efektivita navázání barvy se ověří pomocí spektroskopu (např. Nanodrop 2000 (ThermoScience)).

Vzniklá směs je nanášena na sklo obsahující specifické sondy určené k detekci jednotlivých virů. Seznam sond a jejich sekvence jsou uvedeny v následující tabulce:

Sonda	Virus	Sekvence
BaYMV-1	BaYMV	TCACAACTGATGAGGCATGGATCGATGCCCTCA
BaYMV-2	BaYMV	ACAAGCATGCTGAGAATCAAGTAATGCAAA
BaYMV-1rc	BaYMV	TGAGGGCATCGATCCATGCCTCATCAGTTGTGA
BaYMV-2rc	BaYMV	TTTGCATTACTTGATTCTCAGCATGCTTGT
BSMV-3	BSMV	GGCATGGATGTTGTGAAGAAATTCGCCGTCATGT CAGT
BSMV-4	BSMV	ATCTTTGGTGAAACGGTTGCTACAGGAACAACCC C
BSMV-3rc	BSMV	ACTGACATGACGGCGAATTTCTTCACAACATCCA TGCC

BSMV-4rc	BSMV	GGGGTTGTTCTGTAGCAACCGTTTCACCAAAGA T
BYDV-spc-1	BYDV	GAGCAGGCGCTTAAGTGGGAACACGGGA
BYDV-spc-2	BYDV	GTGAATGAATTCAGTAGGCCGTAG
BYDV-1	BYDV	AAGTCCTACCACCGTTACAAGATCACAA
BYDV-spc-3	BYDV	CTGGGAATCATTCGGAGTTGACCCT
BYDV-2	BYDV	TCTTACGGTAAGTGCCCAACTCCA
BYDV-spc-1rc	BYDV	TCCCGTGTTCCCACTTAAGCGCCTGCTC
BYDV-spc-2rc	BYDV	CTACGGCCTACTGAATTCATTAC
BYDV-1rc	BYDV	TTGTGATCTTGTAACGGTGGTAGGACTT
BYDV-spc-3rc	BYDV	AGGGTCAACTCCGAATGATTCCCAG
BYDV-2rc	BYDV	TGGAGTTGGGCACTTACCGTAAGA
CoSV-1	CoSV	AAGATAACRTGTGGAGCTTGTCAGATCAG
CoSV-1rc	CoSV	CTGATCTTGACAAGCTCCACAYGTTATCTT
LLV-1	LLV	ATCGACCTYTTCTGCCAGTTCCACCCTAGYGTGG A
LLV-1rc	LLV	TCCACRCTAGGGTGGAACTGGCAGAAARAGGTCTG AT
MDMV-1	MDMV	GGGCTGARTTYGATAGATGGTATGARGCAGTRC

		AGAA
MDMV-3	MDMV	AAC TTTCTTACACTGTGGCACGCGACATGAGAAC AACCAATTCA
MDMV-1rc	MDMV	TTCTGYACTGCTCATACCATCTATCRAAYTCAG CCC
MDMV-3rc	MDMV	TGAATTGGTTGTTCTCATGTCGCGTGCCACAGTG TAAGAAAGTT
SBWMV-1	SBWMV	AAATGACGGTTTGGGTCTGAARTATGA
SBWMV-2	SBWMV	AGTTGACGGGAYGGCGTCTCGGR
SBWMV-1rc	SBWMV	TCATAYTTGACCCAAACCGTCATTT
SBWMV-2rc	SBWMV	YCCGAGACGCCRTCCCGTCAACT
SCSMV-1	SCSMV	AGTGGGTTTCAGTTCTCGGTTCTAGCGGGAAAC CCATAATACC
SCSMV-1rc	SCSMV	GGTATTATGGGTTTCCCGCTACGAACCGAGAACT GAACCCACT
SpMV-1	SpMV	GTCTATGTGACTTCCATCCGTAGTGTGGTTTCCA CGAAG
SpMV-1rc	SpMV	CTTCGTGGAAACCACACTACGGATGGAAGTCAC ATAGAC
WDV-1	WDV	GCATTGGGATTGGTGATGGAAGCACGAAGCTTG T
WDV-2	WDV	GCAGATGTGGTGATCCATCTTCGTGG

WDV-1rc	WDV	ACAAGCTTCGTGCTTCCATCACCAATCCCAATGC
WDV-2rc	WDV	CCACGAAGATGGATCACCACATCTGC
WDV-3	WDV-univ	AGATGTTTCATTTTTCCAGCTTTCAATGGTCTCATG
WDV-3rc	WDV-univ	CATGAGACCATTGAAAGCTGGAAAAATGAACATC T
WSMV-1	WSMV	GCGAAGCCATCACTTCGAGCCATT
WSMV-2	WSMV	GGAGCTCGAGTGATGATCGAGGAGAGTGTTTC
WSMV-1rc	WSMV	AATGGCTCGAAGTGATGGCTTCGC
WSMV-2rc	WSMV	GAACACTCTCCTCGATCATCACTCGAGCTCC

Výsledky hybridizace jsou analyzovány v čtečce k tomu určené. Z pokusu jsou následně odstraněny veškeré rostliny, v nichž byl detekován virus jiný než testovaný.

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 používat rezistentní odrůdy.

Průmyslová využitelnost

Microarray čipy se specifickými genovými sekvencemi určenými pro diagnostiku virů obilnin je možno dodávat laboratorním 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 epidemickým výskytům.

Použitá literatura

Boonham N., Walsh K., Smith P., Madagan K., Graham I., Barker I. 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *J. Virol. Methods* 108, 181-187.

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.

Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *Journal of General Virology*, 34: 51–857.

Grover V., Piercea M. L., Hoyta P., Zhanga F., Melcher 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.

Melcher U., Muthukumar V., Wiley G.B., Min B.E., Palmer M. W., Verchot-Lubicz J., Nelson R.S., Roe B.A., Ali A., Thapa V., Pierce M.L. 2008. Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from *Ambrosia psilostachya*. *J. Virol. Methods* 152: 49-55.

Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E., 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* 99, 81-92.

Webster C.G., Wylie S.J. a Jones M.G.K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Curr. Sci.* 86, 1604-1607.

PATENTOVÉ NÁROKY

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

Sonda	Virus	Sekvence
BaYMV-1	BaYMV	TCACAACCTGATGAGGCATGGATCGATGCCCTCA
BaYMV-2	BaYMV	ACAAGCATGCTGAGAATCAAGTAATGCAAA
BaYMV-1rc	BaYMV	TGAGGGCATCGATCCATGCCTCATCAGTTGTGA
BaYMV-2rc	BaYMV	TTTGCATTACTTGATTCTCAGCATGCTTGT
BSMV-3	BSMV	GGCATGGATGTTGTGAAGAAATTCGCCGTCATG TCAGT
BSMV-4	BSMV	ATCTTTGGTGAAACGGTTGCTACAGGAACAACC CC
BSMV-3rc	BSMV	ACTGACATGACGGCGAATTTCTTCACAACATCC ATGCC
BSMV-4rc	BSMV	GGGGTTGTTCTGTAGCAACCGTTTCACCAAAG AT
BYDV-spc-1	BYDV	GAGCAGGCGCTTAAGTGGGAACACGGGA
BYDV-spc-2	BYDV	GTGAATGAATTCAGTAGGCCGTAG
BYDV-1	BYDV	AAGTCCTACCACCGTTACAAGATCACAA
BYDV-spc-3	BYDV	CTGGGAATCATTCTGGAGTTGACCCT
BYDV-2	BYDV	TCTTACGGTAAGTGCCCAACTCCA
BYDV-spc-1rc	BYDV	TCCCGTGTTCCCACTTAAGCGCCTGCTC

BYDV-spc-2rc	BYDV	CTACGGCCTACTGAATTCATTCAC
BYDV-1rc	BYDV	TTGTGATCTTGTAACGGTGGTAGGACTT
BYDV-spc-3rc	BYDV	AGGGTCAACTCCGAATGATTCCCAG
BYDV-2rc	BYDV	TGGAGTTGGGCACTTACCGTAAGA
CoSV-1	CoSV	AAGATAACRTGTGGAGCTTGTCAAGATCAG
CoSV-1rc	CoSV	CTGATCTTGACAAGCTCCACAYGTTATCTT
LLV-1	LLV	ATCGACCTYTTCTGCCAGTTCCACCCTAGYGTG GA
LLV-1rc	LLV	TCCACRCTAGGGTGGAACTGGCAGAAARAGGTC GAT
MDMV-1	MDMV	GGGCTGARTTYGATAGATGGTATGARGCAGTRC AGAA
MDMV-3	MDMV	AACTTTCTTACACTGTGGCACGCGACATGAGAA CAACCAATTCA
MDMV-1rc	MDMV	TTCTGYACTGCYTCATACCATCTATCRAAYTCAG CCC
MDMV-3rc	MDMV	TGAATTGGTTGTTCTCATGTGCGGTGCCACAGT GTAAGAAAGTT
SBWMV-1	SBWM V	AAATGACGGTTTGGGTCTGAARTATGA
SBWMV-2	SBWM V	AGTTGACGGGAYGGCGTCTCGGR
SBWMV-1rc	SBWM V	TCATAYTTGACCCAAACCGTCATTT

SBWMV-2rc	SBWM V	YCCGAGACGCCRTCCCGTCAACT
SCSMV-1	SCSM V	AGTGGGTTTCAGTTCTCGGTTCTAGCGGGAAA CCCATAATACC
SCSMV-1rc	SCSM V	GGTATTATGGGTTTCCCGCTACGAACCGAGAAC TGAACCCACT
SpMV-1	SpMV	GTCTATGTGACTTCCATCCGTAGTGTGGTTTCC ACGAAG
SpMV-1rc	SpMV	CTTCGTGGAAACCACACTACGGATGGAAGTCAC ATAGAC
WDV-1	WDV	GCATTGGGATTGGTGATGGAAGCACGAAGCTT GT
WDV-2	WDV	GCAGATGTGGTGATCCATCTTCGTGG
WDV-1rc	WDV	ACAAGCTTCGTGCTTCCATCACCAATCCCAATG C
WDV-2rc	WDV	CCACGAAGATGGATCACCACATCTGC
WDV-3	WDV- univ	AGATGTTTCATTTTTCCAGCTTTCATGGTCTCAT G
WDV-3rc	WDV- univ	CATGAGACCATTGAAAGCTGGAAAAATGAACAT CT
WSMV-1	WSMV	GCGAAGCCATCACTTCGAGCCATT
WSMV-2	WSMV	GGAGCTCGAGTGATGATCGAGGAGAGTGTTTC
WSMV-1rc	WSMV	AATGGCTCGAAGTGATGGCTTCGC
WSMV-2rc	WSMV	GAACACTCTCCTCGATCATCACTCGAGCTCC