

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 435

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/40 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-34372**
(22) Přihlášeno: **21.11.2017**
(47) Zapsáno: **06.02.2018**

(73) Majitel:
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha 6,
Ruzyně, CZ

(72) Původce:
Ing. Jana Jarošová, Ph.D., Okoř, CZ
Ing. Jiban Kumar, Ph.D., Buštěhrad, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Reakční směs pro detekci a kvantifikaci
RNA tří obilných virů (WDV, WSMV,
BYDV) pomocí TaqMan Real-time RT-PCR**

CZ 31435 U1

Reakční směs pro detekci a kvantifikaci RNA tří obilných virů (WDV, WSMV, BYDV) pomocí TaqMan Real-time RT-PCR

Oblast techniky

Řešení se týká reakční směsi a postupu pro současnou detekci a kvantifikaci RNA tří obilných virů - viru žluté zakrslosti ječmene, viru čárkovitosti pšenice a viru zakrslosti pšenice s využitím molekulární detekce a kvantifikace virové RNA molekulární metodou reverzní transkripce - polymerázové řetězové reakce v reálném čase (dále RT-qPCR).

Dosavadní stav techniky

Obilniny se pěstují na rozloze téměř 1600 tisíc hektarů, což představuje více než 60 % z celkové výměry orné půdy České republiky. Kvůli rozsáhlému pěstování a jednoduchým osevním postupům jsou obilniny napadány mnoha patogeny. Virózy obilnin patří mezi významné choroby, které mohou způsobovat velké výnosové ztráty. Proti virovým chorobám rostlin neexistuje v současné době účinná ochrana.

Dva nejdůležitější viry obilnin v ČR jsou virus žluté zakrslosti ječmene (*Barley yellow dwarf virus* - BYDV) a virus zakrslosti pšenice (*Wheat dwarf virus* - WDV). Dokážou způsobit závažné ztráty na výnosech u většiny obilných druhů, jako pšenice, ječmen a oves. V posledních letech jsou na různých územích naší země zaznamenávány lokality s vyšším výskytem virové čárkovité mozaiky pšenice (*Wheat streak mosaic virus* - WSMV). Na území České republiky byl výskyt WSMV poprvé zaznamenán Dr. Vackem v 80. letech minulého století. V posledních letech dochází k dalším, četnějším a častějším nálezům této choroby, včetně plošných výskytů v porostech pšenice.

Současné diagnostické metody rostlinných virů jsou založeny buď na detekci virových proteinů pomocí sérologických metod, nebo na molekulární detekci virové nukleové kyseliny.

Sérologickými testy (ELISA test) je možno dosáhnout semi-quantitativní analýzy, kdy je vzorek ředěn aritmetickou řadou (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 atd.). Tato metoda je nicméně schopna titr virů jen porovnat a ne absolutně stanovit. Limity citlivosti jsou u této metody poměrně omezené. Pomocí této metody lze v každé eseji stanovit pouze jeden patogen.

Nukleové kyseliny patogenů se stanovují nejčastěji pomocí RT-PCR, kdy u RNA virů dojde nejprve k přepisu do cDNA a ta je poté amplifikována za pomoci druhově specifických primerů. Při vhodném navržení různých délek koncových produktů PCR lze detekovat několik různých patogenů současně (Multiplex PCR), obvykle je však snížena citlivost detekce.

Metoda TaqMan RT-qPCR založená na detekci virových nukleových kyselin pomocí specifických primerů a sond v reálném čase je jednou z nejspolehlivějších v současnosti existujících kvantifikačních metod. Při RT-qPCR je produkt detekován a měřen po každém cyklu, což umožňuje detekci produktu a zároveň kvantifikaci výchozího množství templátu. TaqMan sondy jsou dvojité barvené hydrolyzační sondy nesoucí na 5' konci reportérový fluorofor, na 3' konci molekulu zhášeče. Existuje několik fluoroforů různých vlnových délek, které lze kombinovat v jedné eseji a takto účinně detekovat a kvantifikovat více patogenních činitelů současně.

Pro BYDV, WDV i WSMV byly vyvinuty primery a sondy umožňující jejich detekci pomocí TaqMan RT-qPCR (Fabre *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Nebyla však vyvinuta metoda umožňující detekovat všechny tři patogeny v jedné reakci současně. Primery a sondy navržené pro detekci WSMV v USA také nejsou v Evropě použitelné, neboť genetická variabilita viru je činí pro naše podmínky velmi necitlivé a naprosto nevhodné.

Podstata technického řešení

V technickém řešení je uvedena reakční směs pro detekci a kvantifikaci tří obilných virů - viru žluté zakrslosti ječmene, viru čárkovitosti pšenice a viru zakrslosti pšenice s využitím RT-qPCR.

Podstata technického řešení spočívá v tom, že ve stejném čase, ve stejných podmínkách proběhne současně tři amplifikační reakce umožňující detekci všech tří virů najednou.

Reakční směs obsahuje 4 μl vzorku testované cDNA, TaqMan® RT-PCR mix, destilovanou vodu a specifické primery a sondy pro detekci viru žluté zakrslosti ječmene. Všechny primery jsou o konečné koncentraci 0,32 μM , sondy o konečné koncentraci 0,16 μM . Konkrétně se jedná o následující primery a sondy:

| | |
|------------|---------------------------------|
| WSM-R | TCCTTTTGATCCTGACCCCTTG |
| WSM-F | AGTGGAAGTACGCAGTCAAG |
| WSM-Taq | Cy5-TGCCATGACCGACACGTTGCTA-BHQ2 |
| 10 BYD-R | GCCCAGCGCTTTCAGAC |
| BYD-F | AAAGCCAACCTCTTCCGGG |
| BYD-Taq | FAM-CAAATTCGGCCCCAGTCTATCGCA |
| WDV-R | CGGTCTGATTTGTATGCCGATT |
| WDV-F | CCCCGGGTCGATCTGATT |
| 15 WDV-Taq | HEX-CCTGTTTTGCTCAGGGTAAGGCCGAT |

cDNA se připraví z izolované RNA rostlin za pomoci náhodných hexamerů a reverzní transkriptázy dle protokolu výrobce dané transkriptázy.

Standards se připraví klonováním purifikovaného RT-PCR produktu do plasmidu a poté do bakterie *E.coli*, následně kultivaci a extrakci plasmidu. Následně se spektrofotometricky zjistí koncentrace RNA, provede se výpočet počtu kopií ve standardu a vytvoří se vhodná diluční řada standardů.

Směsi pro RT-PCR podle technického řešení se připravují v mikrozkušnicích, kapilárách nebo na Real-time PCR desce, a každá obsahuje 4 μl cDNA testovaného vzorku, TaqMan® PCR Master Mix, obsahující 0,25 μl DNA polymerázy o koncentraci 5U/ μl , 5 μl směsi oligonukleotidů o koncentraci 2,5mM, 5 μl pufru obsahujícího MgCl_2 o konečné koncentraci 5,5mM; destilovanou vodu, kterou je každá reakční směs doplněna do konečného objemu 25 μl a 0,8 μl jednotlivých specifických primerů a 0,4 μl jednotlivých specifických sond pro detekci BYDV, WDV a WSMV o koncentraci 10 μM (konkrétně primery BYD-R, BYD-F, WSM-R, WSM-F, WDV-R a WDV-F a sondy BYD-Taq, WDV-Taq a WSM-Taq).

U vzorků, kde je přítomen BYDV, vznikne produkt dlouhý 65 bp produkující signál při vlnové délce 494 až 515 nm. U vzorků, kde je přítomen WDV, vznikne produkt dlouhý 70 bp produkující signál při vlnové délce 535 až 555 nm. U vzorků, kde je přítomen WSMV, vznikne produkt dlouhý 189 bp produkující signál při vlnové délce 651 až 674 nm. V případě přítomnosti jiných virů je reakce negativní. V případě přítomnosti více virů současně lze detekovat několik různých signálů najednou.

Standards BYDV by měly amplifikovat totožně velký produkt za použití stejné reakční směsi, která je použita pro detekci BYDV v testovaných vzorcích, opět současně a za stejných podmínek.

Vlastní qPCR probíhá v Real-time termocykleru nejprve 15 minut při 95 °C. Následuje 40 cyklů, každý obsahuje dva kroky: 15 sekund při 95 °C a 1 minuta při 60 °C.

Toto technické řešení umožňuje přesnou současně probíhající detekci tří nejběžněji se vyskytujících obilných virů, nezávisle na vnějších příznacích. Touto metodou lze docílit vysokých úspor času i financí. Takto průkazných výsledků nebylo dosud dosahováno.

Následující příklady provedení reakční směs podle technického řešení pouze dokládají, aniž by ji jakkoliv omezovaly.

Příklady uskutečnění technického řešení

Vyhodnocení zdravotního stavu jednotlivých porostů pšenice a ječmene středně velkého zemědělského podniku.

5 Zemědělský podnik s 300 ha pšenice ozimé a 60 ha ozimého ječmene zaznamenal porosty s podezřením na virovou infekci. Pro analýzu zdravotního stavu komerčních ploch osetých ozimými obilninami odebere pověřený pracovník v dubnu vzorky ve fázi praporcového listu. Z každého pozemku náhodně odebere listy z různých rostlin. Ze vzorků je v laboratoři izolována celková RNA. Z celkové RNA je syntetizována pomocí reverzní transkriptázy a náhodných hexamerů cDNA.

10 Standardy jsou získány klonováním purifikovaného RT-PCR produktu primerů BYD-R/BYD-F; WDV-R/WDV-F a WSM-R/WSM-F do plazmidů a poté do bakterií *E. coli*, následnou kultivací a extrakcí plazmidu. Spektrofotometricky se měří koncentrace DNA, vypočte se počet kopií ve standardu a vytvoří se diluční řada standardů 10^{-1} až 10^{-10} .

15 4 μ l cDNA jsou napipetovány do sterilní Real-time PCR desky dle náčrtu. Dále je přidán TaqMan® PCR Master Mix obsahující 0,25 μ l DNA polymerázy o koncentraci 5U/ μ l, 5 μ l směsi oligonukleotidů o koncentraci 2,5mM, 5 μ l pufru obsahujícího $MgCl_2$ o konečné koncentraci 5,5mM; 0,8 μ l jednotlivých primerů a 0,4 μ l jednotlivých sond o koncentraci 10 μ M. Objem každé reakce je doplněn destilovanou vodou do 25 μ l. Nakonec byly napipetovány do zvláštních jamek standardy po 4 μ l spolu s TaqMan® PCR Master Mixem, 0,8 μ l jednotlivých primerů
20 a 0,4 μ l jednotlivých sond o koncentraci 10 μ M a vše opět doplněno destilovanou vodou do celkového objemu jednotlivé reakce 25 μ l (dle schématu).

Schéma rozmístění vzorků a standardů na 96-jamkové Real-time PCR desce.

25 Vlastní RT-PCR probíhá v Real-time termocykleru Lightcycler480 (Roche). První část reakce probíhá 10 minut při 95 °C. Následovalo 40 cyklů, každý obsahoval dva kroky: 15 sekund při 95 °C a 1 minuta při 60 °C.

Výsledné C_t hodnoty jednotlivých virů ve vzorcích byly porovnány vůči standardům. Byly zaznamenány porosty s pozitivními výskyty jednotlivých virů.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| A | Standard -1 | Standard -1 | Standard -1 | Standard -10 | Standard -10 | Standard -10 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 |
| B | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | Standard -100 | NTC | NTC |
| C | Sample1 | Sample2 | Sample3 | Sample4 | Sample5 | Sample6 | Sample7 | Sample8 | Sample9 | Sample10 | Sample11 | Sample12 |
| D | Sample1 | Sample2 | Sample3 | Sample4 | Sample5 | Sample6 | Sample7 | Sample8 | Sample9 | Sample10 | Sample11 | Sample12 |
| E | Sample1 | Sample2 | Sample3 | Sample4 | Sample5 | Sample6 | Sample7 | Sample8 | Sample9 | Sample10 | Sample11 | Sample12 |
| F | Sample13 | Sample14 | Sample15 | Sample16 | Sample17 | Sample18 | Sample19 | Sample20 | Sample21 | Sample22 | Sample23 | Sample24 |
| G | Sample13 | Sample14 | Sample15 | Sample16 | Sample17 | Sample18 | Sample19 | Sample20 | Sample21 | Sample22 | Sample23 | Sample24 |
| H | Sample13 | Sample14 | Sample15 | Sample16 | Sample17 | Sample18 | Sample19 | Sample20 | Sample21 | Sample22 | Sample23 | Sample24 |

30 Takto lze testovat materiál jak na šlechtitelských stanicích, tak rostliny z polních odběrů nebo laboratorních izolátů. Protože virovou infekci nelze nijak léčit, je jedinou ochranou proti virovým chorobám obilnin použití rezistentních odrůd nebo preventivní kroky zabraňující dalšímu šíření virů včetně včasné detekce.

Průmyslová využitelnost

35 Reakční směsi pro současnou detekci a kvantifikaci BYDV, WDV a WSMV je možno dodávat laboratořím zabývajícím se ochranou proti rostlinným patogenům jako detekční a kvantifikační kit k okamžitému použití (ready - to use). Uživateli pak stačí pouze přidat svůj vzorek testované cDNA a provést reakci dle přesně stanovených podmínek.

Použitá literatura:

- Fabre F, Kervarrec C, Mieuxet L, Riault G, Vialatte A, Jacquot E, 2003. Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 110, 51–60.
- 5 Price JA, Smith J, Simmons A, Fellers J, Rush CM, 2010. Multiplex real-time RT-PCR for detection of Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Journal of virological methods* 165, 198–201.
- Zhang X, Zhou G, Wang X, 2010. Detection of wheat dwarf virus (WDV) in wheat and vector leafhopper (*Psammotettix alienus* Dahlb.) by real-time PCR. *Journal of virological methods* 169, 416–419.
- 10

NÁROKY NA OCHRANU

1. Reakční směs pro detekci a kvantifikaci tří obilných virů – BYDV, WDV a WSMV pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase, **vyznačující se tím**, že reakční směs obsahuje 4 µl vzorku testované cDNA; TaqMan PCR Master Mix, který obsahuje 0,25 µl DNA polymerázy o koncentraci 5 U/µl, 5 µl směsi oligonukleotidů o koncentraci 2,5mM, 5 µl pufru obsahujícího MgCl₂ o konečné koncentraci 5,5mM; 4,8 µL specifických primerů o koncentraci 10µM pro detekci BYDV, WDV a WSMV, konkrétně
- 0,8 µl primeru BYD-R o sekvenci **5'- GCCCAGCGCTTTCAGAC -3'**;
- 0,8 µl primeru BYD-F o sekvenci **5'- AAAGCCAACCTCTCCGGG -3'**,
- 20 0,8 µl primeru WDV-F o sekvenci **5'- CCCCGGGTCGATCTGATT -3'**,
- 0,8 µl primeru WDV-R o sekvenci **5'- CGGTCTGATTTGTATGCCGATT -3'**,
- 0,8 µl primeru WSM-R o sekvenci **5'- TCCTTTTGATCCTGACCCTTG -3'**,
- 0,8 µl primeru WSM-F o sekvenci **5'- AGTGGAAGTACGCAGTCAAG -3'**;
- 1,2 µl specifických sond o koncentraci 10µM pro detekci BYDV, WDV a WSMV, konkrétně 0,4 µl sondy BYD-Taq o sekvenci **5'-FAM-CAAATTCGGCCCCAGTCTATCGCA-**
- 25 **-BHQ1-3'**,
- 0,4 µl sondy WDV-Taq o sekvenci **5'-HEX-CCTGTTTTGCTCAGGGTAAGGCCGAT-**
- BHQ1-3'**,
- 0,4 µl sondy WSM-Taq o sekvenci **5'-Cy5-TGCCATGACCGACACGTTGCTA-BHQ2-3'**; a
- 30 destilovaná voda doplňující reakční směs do konečného objemu 25 µl.

Konec dokumentu
