

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 530

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)
C12R 1/94 (2006.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/40 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37711**
(22) Přihlášeno: **24.06.2020**
(47) Zapsáno: **16.11.2020**

(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 kvantifikaci karanténního
RNA viru kroužkovitosti tabáku v rajčatech
(Solanum lycopersicum)**

Reakční směs pro kvantifikaci karanténního RNA viru kroužkovitosti tabáku v rajčatech
(*Solanum lycopersicum*)

5 Oblast techniky

Řešení se týká reakční směsi a postupu pro současnou detekci a kvantifikaci RNA karanténního viru kroužkovitosti tabáku v rajčatech (*Solanum lycopersicum*) za použití referenčních genů rostliny jakožto normalizačních faktorů.

10

Dosavadní stav techniky

15 Virus kroužkovitosti tabáku (TRSV) je karanténní škodlivý organismus, jehož zavlékání a rozšiřování je na území EU zakázáno. Virus kroužkovitosti tabáku byl poprvé popsán v Americe ve 30. letech 20. století na rostlinách tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*). TRSV má mnohé bylinné i dřevité hostitele včetně rajčete a může způsobovat závažné choroby s výraznými ekonomickými dopady.

20 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.

25

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. Pro přesnou kvantifikaci je nutno získaná data normalizovat za pomoci tzv. referenčních genů hostitele (tj. rajče v tomto případě).

30

Pro TRSV byly vyvinuty primery umožňující detekci pomocí RT-qPCR. Nebyla však vyvinuta metoda umožňující normalizaci kvantifikace pomocí referenčních genů rajčete.

35 Podstata technického řešení

V technickém řešení je uvedena reakční směs pro detekci a kvantifikaci dvou referenčních genů rajčete (elongační faktor 1 α – EF1 a subjednotka adaptoru klatrinového komplexu – CAC) a genomu viru kroužkovitosti tabáku (TRSV) s využitím RT-qPCR. Podstata technického řešení spočívá v tom, že se jedná o tři reakční směsi a ve stejném čase, ve stejných podmínkách proběhnou na jedné destičce současně tři amplifikační reakce umožňující detekci a kvantifikaci TRSV najednou.

45 Reakční směs obsahuje 4 μ l vzorku testované cDNA, SYBR Green based PCR mix, destilovanou vodu a specifické primery pro kvantifikaci mRNA EF1, CAC a detekci a kvantifikaci TRSV. Všechny primery jsou o konečné koncentraci 2 μ M. Konkrétně se jedná o následující primery a sondy:

EF1-R	ACCGGCATCACCATTCTTCA
EF2-F	GATTGACAGACGTTCTGGTAAGGA
CAC-R	ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG
CAC-F	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG
TRSV-R	GCACCAGCGTAAGAACCCAA
TRSV-F	GGGGTGCTTACTGGCAAGG

55

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

Směsi pro RT-PCR podle technického řešení se připravují v mikrozkuřkách, kapilárách nebo na Real-time PCR desce, a každá obsahuje 4 µl cDNA testovaného vzorku, SYBR green PCR Master Mix, obsahující 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; destilovanou vodu, kterou je každá reakční směs doplněna do konečného objemu 25 µl a 0,5 µl jednotlivých specifických primerů pro detekci a kvantifikaci mRNA referenčních genů rajčete o původní koncentraci 10µM (konkrétně primery EF1-R, EF1-F, CAC-R, CAC-F); a primery pro kvantifikaci TRSV (konkrétně primery TRSV-R a TRSV-F). Pro jeden vzorek jsou tedy přichystány tři reakce (EF1; CAC; TRSV) na jedné PCR desce nebo v jednotlivých mikrozkuřkách.

Při amplifikaci mRNA EF1 vznikne produkt dlouhý 67 bp. Při amplifikaci mRNA CAC vznikne produkt dlouhý 172 bp. Při amplifikaci TRSV vznikne produkt dlouhý 90 bp.

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 a normalizaci kvantifikace TRSV. Touto metodou lze docílit vysokých úspor času. 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 reakcí různých odrůd rajčete (*Solanum lycopersicum*) na infekci TRSV.

V hodnoceném pokusu byly v kontrolovaných podmínkách uměle inokulovány virem kroužkovitosti tabáku. V určitých časových intervalech jsou z každé rostliny odebrány vzorky listů. Ze vzorků je v laboratorii izolována celková RNA. Z celkové RNA je syntetizována cDNA pomocí reverzní transkriptázy a náhodných hexamerů.

Každý vzorek je napipetován v technickém triplicátu třikrát – tj. jeden technický triplicát pro kvantifikaci mRNA EF1, jeden technický triplicát pro kvantifikaci mRNA CAC a jeden technický triplicát pro detekci a kvantifikaci TRSV.

4 µl cDNA jsou napipetovány do sterilní Real-time PCR desky. Dále je přidán SYBR Green PCR Master Mix obsahující 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; 0,5 µl jednotlivých primerů o koncentraci 10µM. Objem každé reakce je doplněn destilovanou vodou do 25 µl.

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

Výsledné C_q hodnoty TRSV ve vzorcích jsou porovnány vůči zprůměrovaným hodnotám C_q hodnot mRNA referenčních genů rajčete. Titr jednotlivých virů je porovnán v jednotlivých skupinách.

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 viróz včetně včasné detekce.

5

Průmyslová využitelnost

- 10 Reakční směsi pro současnou detekci a kvantifikaci TRSV v rajčeti (*Solanum lycopersicum*) je možno dodávat laboratořím zabývajícím se ochranou proti rostlinným patogenům jako detekční a kvantifikační kit k okamžitému použití (ready - to use). Uživatelé pak stačí pouze přidat svůj vzorek testované cDNA a provést reakci dle přesně stanovených podmínek.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Reakční směs pro současnou detekci a kvantifikaci RNA TRSV - viru kroužkovitosti tabáku
 5 za pomoci dvou referenčních genů rajčete jakožto normalizačních faktorů pomocí polymerázové
 řetězové reakce v reálném čase vyznačující se tím, že je současně tvořena třemi reakčními
 směsmi, obsahující každá 4 μ l vzorku testované cDNA; SYBR Green PCR Master Mix, který
 obsahuje 0,25 μ l DNA polymerázy o koncentraci 5 U/ μ l, 5 μ l směsi oligonukleotidů
 o koncentraci 2,5mM, 5 μ l pufru obsahujícího $MgCl_2$ o konečné koncentraci 5,5mM; 1 μ L
 10 specifických primerů o původní koncentraci 10 μ M pro kvantifikaci mRNA rajčete EF1 -
 elongační faktor 1 α , CAC - subjednotka adaptoru klatrinového komplexu a detekci a kvantifikaci
 TRSV, konkrétně
 v jedné reakční směsi 0,5 μ l primeru EF1-R,
 tvořeného sekvencí **5'-ACCGGCATCACCATCTTCA-3'**,
 15 0,5 μ l primeru EF1-F tvořeného sekvencí **5'-GATTGACAGACGTTCTGGTAAGGA-3'**,
 ve druhé reakční směsi 0,5 μ l primeru CAC-R tvořeného sekvencí
5'-ATTGGTGGAAAGTAACATCATCG-3',
 0,5 μ l primeru CAC-F tvořeného sekvencí **5'-CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG-3'**,
 ve třetí reakční směsi 0,5 μ l primeru TRSV-R
 20 tvořeného sekvencí **5'-GCACCAGCGTAAGAACCCTAA-3'**,
 0,5 μ l primeru TRSV-F tvořeného sekvencí **5'-GGGGTGCTTACTGGCAAGG-3'**;
 a destilovanou vodu doplňující každou reakční směs do konečného objemu 25 μ l.