



Metodické listy OPVK

Diagnostické metody detekce patogenních organismů



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



DIAGNOSTICKÉ METODY DETEKCE PATOGENNÍCH ORGANISMŮ

Ovocné dřeviny trpí chorobami, které jsou často přítomností virů, fytoplazem, bakterií nebo hub. Tyto organizmy mohou způsobovat výrazné hospodářské ztráty. Často mohou být v pletivech rostlin přítomny v latentní formě. Vzhledem k tomu, že infikované dřeviny nelze léčit, zůstávají základními prostředky k ochraně preventivní opatření, mezi které patří zejména používání certifikované sadby při zakládání produkčních výsadeb. Stěžejní částí certifikačního procesu je diagnostika těchto patogenů pomocí *laboratorních a biologických metod*. Jako laboratorní metody jsou využívány imunoenzymatická metoda (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA), polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, PCR), reverzní transkripce s následným využitím polymerázové řetězové reakce (reverse transcription – polymerase chain reaction, RT-PCR) a izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (Loop mediated isothermal amplification, LAMP-PCR). V oblasti biologického indexingu jsou rostliny testovány pomocí dřevinných indikátorů.

Hospodářsky významné škodlivé organismy: Spektrum patogenů vyskytujících se na ovocných plodinách je široké. Mezi hospodářsky významně škodlivé choroby jsou řazeny např. virové neštovice slivoně (šarka) a fytoplazmózy.

Původcem onemocnění virové neštovice slivoně je *Plum pox virus (PPV)*. Tato choroba napadá slivoň (*Prunus domestica*), meruňku (*Prunus armeniaca*), broskvoň (*Prunus persica*) a další ovocné, okrasných i plané druhy rodu *Prunus* sp. Projevem symptomů, jako jsou kroužkovité kresby na slupce a deformace plodů, jejich předčasný opad a snížená cukernatost, výrazně snižují kvalitu ovoce a působí ekonomické ztráty. Na listech se projevuje tvorbou chlorotické kroužkovité mozaiky, či difuzními skvrnami. Toto onemocnění se šíří prostřednictvím infikovaného množitelského materiálu a ve volné přírodě jsou jeho vektorem mšice (*Aphis*).

Projev infekce PPV na listech slivoně



Infekce PPV na plodech švestky domácí

Za původce fytoplazmóz byly označeny mikroorganismy, které byly dříve řazeny mezi bakterie. K jejich šíření dochází prostřednictvím infikovaného rozmnožovacího materiálu. Ve volné přírodě jsou jejich vektory mery rodu *Cacopsylla*.

'*Candidatus Phytoplasma mali*' je původcem onemocnění fytoplazmová proliferace jabloně (apple proliferation). Hlavními příznaky jsou metlovitost výhonů, zvětšené palisty a chloróza listů, které mohou být menší a protáhlé. U extrémně náchylných odrůd je narušen, poškozen a oslaben celkový habitus rostliny s následkem omezení tvorby plodů či zmenšení plodů.

Původcem onemocnění fytoplazmové chřadnutí hrušně (pear decline) je 'Ca. Ph. pyri'. Typickými příznaky je svinování a předčasné červenání listů. Škodlivost této choroby spočívá v tom, že způsobuje nekrotické odumírání floému a následkem toho větve napadených stromů mívají menší přírůstky, vyholují a může docházet až k předčasnému úhynu celého stromu.



Symptomy fytoplazmové proliferace jabloně



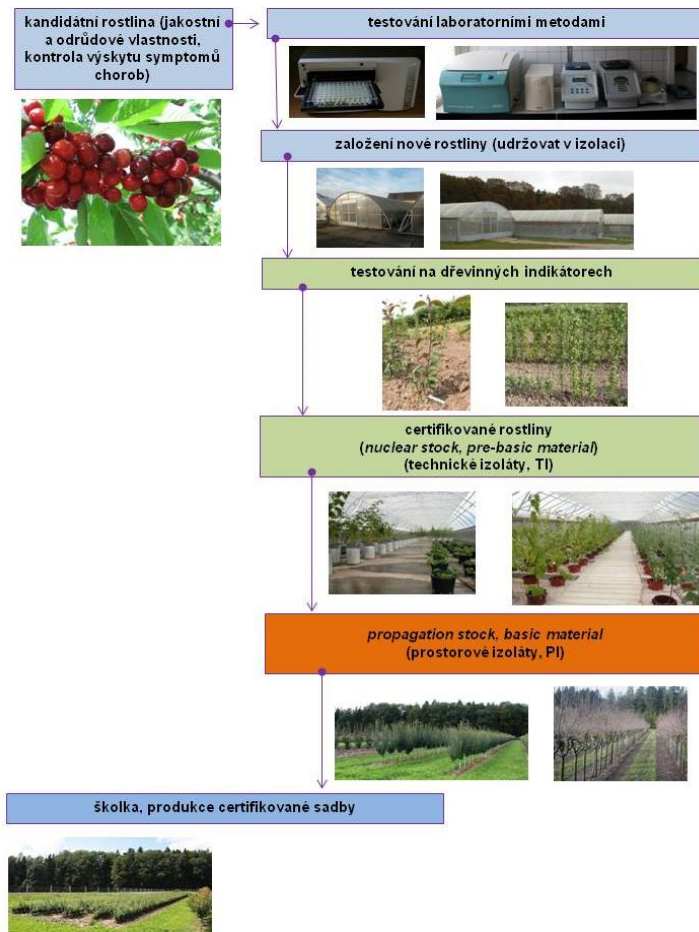
Příznaky onemocnění fytoplazmového chřadnutí



Symptomy fytoplazmové evropské žloutenky na meruňce (*P. armeniaca*)

Fytoplazmová evropská žloutenka peckovin (European stone fruit yellows phytoplasma ESFY) je vyvolána původcem 'Ca. Ph. prunorum'. Je považována za jednu z hlavních příčin předčasného odumírání meruňkových, broskvoňových a slivoňových stromů. Hlavní symptomy, podle kterých ji lze identifikovat je svinování a žloutnutí listů.

Certifikace rozmnožovacího materiálu je prováděna podle schématu, v rámci kterého se provádí systematická kontrola a testování kandidátních rostlin, vybraných pro tvorbu množitelského materiálu, na přítomnost širokého spektra škodlivých organismů. V rámci tohoto schématu se využívají všechny dostupné diagnostické metody. Tento proces umožňuje produkovat a uvádět do oběhu zdravý rostlinný materiál odrůd a podnoží ovocných dřevin. Testování je prováděno na základě doporučení metodik Evropské a středozemní organizace ochrany rostlin (EPPO).



Praktické schéma certifikace rozmnožovacího materiálu ovocných plodin (TI - technické izoláty, PI - prostorové izoláty)

ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je imunoenzymatická metoda založená na vysoce specifické interakci antigenu diagnostikovaného patogenu a protilátky. Vzniká tak imunokomplex antigen-protilátka. Tento proces probíhá tak, že se na specifickou protilátku (Imunoglobulin G, IgG), která je navázána na stěnách jamky mikrotitrační destičky, naváže antigen patogenu. Na něj se posléze naváže enzymově označená protilátka přidaná v dalším kroku analýzy. Tato protilátka je též specifická pro konkrétní antigen (IgG



Zleva: zasušená pozitivní kontrola PPV, protilátka PPV IgG (Bioreba, Swiss), protilátka IgG konjugovaná (Bioreba, Swiss), 4-nitrofenylfosfát - substrát



conjugate.). V dalším kroku je do reakční směsi přidán substrát, který je za pomoci enzymu obsaženého v IgG conj., přeměněn na barevný produkt. Výsledné zabarvení konečného produktu stanovujeme spektrofotometricky a je přímo úměrné koncentraci antigenu ve vzorku.

Ve VŠÚO je tato laboratorní diagnostická metoda využívána k diagnostice virů ovocných plodin. Za nejzávažnější chorobu, jejímž původcem je plum pox virus (PPV), je považována choroba virové neštovice slivoně (šarka).

Nároky na technické a materiální vybavení: Přesné váhy, pH-metr, magnetická míchačka, analytické váhy, homogenizátor, teplotní inkubátor, promývačka, spektrofotometr, pipety, špičky, mikrotitrační destičky, zkumavky

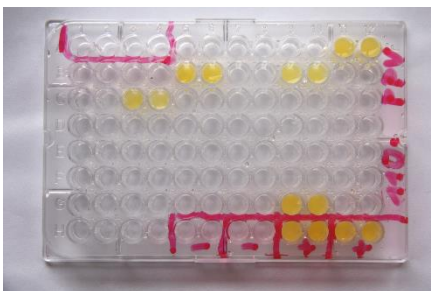
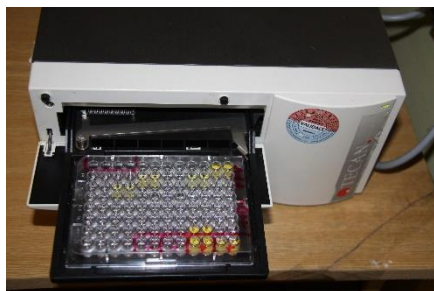
Chemikálie: Roztok pufru PBS, extrakční pufr, potahovací pufr, konjugační pufr, substrátový pufr, vymývací pufr, 4-nitrofenylfosfát – substrát, protilátka PPV IgG (Bioreba, Swiss), protilátka IgG konjugovaná (Bioreba, Swiss)

Stručný laboratorní postup metody ELISA

- 1. Příprava vzorků.** Pro účely vyhodnocení výsledků analýzy zařazujeme do sady testovaných vzorků minimálně dvě **negativní kontroly**. Dále jsou přiřazeny vzorky minimálně jedné, lépe dvou kontrolních rostlin, u kterých byla v minulosti potvrzena přítomnost diagnostikovaného viru (**pozitivní kontroly**). Pro tyto účely používáme infikované rostliny uchovávané ve sbírce virů ovocných dřevin ve VŠÚO Holovousy s.r.o. Ze všech rostlinných vzorků určených pro provedení analýzy navažujeme 0,2 g listové tkáně, případně pupenů, kůry nebo květů.
- 2. Příprava extraktu.** K naváženému vzorku přidáváme extrakční pufr v poměru 1 : 20 (na 0,1 g vzorku 2 ml extrakčního pufru), homogenizujeme a získaný výluh pipetujeme do mikrotitračních destiček.
- 3. Potahování.** Na jamky mikrotitrační destičky navážeme protilátku pomocí nanášení potahovacího pufru, ve kterém jsme rozpustili protilátku IgG.
- 4. Vymytí protilátky z destičky.** Přebytek protilátky vylijeme a důkladně vytřepeme. Následně promývačkou jamky 3x promyjeme vymývacím pufrem.
- 5. Nanášení extraktu rostlinného vzorku a jejich inkubace.** Do jednotlivých jamek postupně pipetujeme připravený rostlinný extrakt ze vzorků, extrakt jednoho vzorku pipetujeme vždy do dvou sousedních jamek.
- 6. Vymytí vzorků z destičky.** Vzorek z jamek vymyjeme stejným způsobem, jako jsme vymývali protilátku.
- 7. Konjugování.** Na antigen vzorku, který vytvořil komplex s navázanou protilátkou, navážeme konjugovanou protilátku IgG, a to přidáním konjugačního pufru s konjugovanou protilátkou IgG do jamek mikrotitrační destičky.
- 8. Vymytí konjugátu.** Přebytečnou konjugovanou protilátku vylijeme a promývačkou promyjeme.
- 9. Substrátování.** Do jamek mikrotitrační destičky napipetujeme substrátový pufr s rozpuštěným 4-nitrofenylfosfátem.
- 10. Vyhodnocování výsledků.** K vyhodnocení intenzity zbarvení substrátu používáme spektrofotometr TECAN, Sunrise RC. Měření hodnot absorbance provádíme po 60 a v některých případech po 120 minutách inkubace. Hodnocení výsledků analýzy provádíme na základě výpočtu *hraniční hodnoty absorbancí negativních kontrol*. Postupujeme tak, že nejprve vypočítáme **průměrnou absorbanci negativní kontroly (X) a její směrodatnou odchylku (s)**. Tyto hodnoty vložíme do vzorce: $X + 3 \cdot s = A_p$. Absorbance vzorku, která je nižší, než je **prahová absorbance negativního vzorku (A_p)** považujeme za negativní (-), absorbance vzorku, která je vyšší než prahová absorbance negativní kontroly a nižší než její přibližný dvojnásobek považujeme za podezřelé (pd). Absorbanci vzorku, mající hodnotu přibližně dvakrát vyšší než je A_p , považujeme za pozitivní (+).



1-2. Nanášení potahovacího pufru (potahování) na mikrotitrační destičku. 3. Homogenizace vzorku pomocí homogenizátoru. 4. Nanášení homogenizovaných vzorků do jamek mikrotitrační destičky



1. Vkládání mikrotitrační destičky do spektrofotometru. 2. Mikrotitrační destička, připravená pro hodnocení výsledků diagnostiky PPV ve vzorcích: jamky se žlutě zbarveným substrátovým roztokem - pozitivní výsledek

PCR

Hlavním principem diagnostické metody PCR (polymerázová řetězová reakce) je zmnožení specifických úseků DNA detekovaného mikroorganismu do početných množství kopií, které pak díky tomu lze několika způsoby vyhodnotit např. pomocí elektroforetické separace. VŠÚO Holovousy s.r.o. využívá diagnostickou metodu PCR k detekci fytoplazem izolovaných z rostlinného materiálu. Vzhledem k tomu, že jsou titry fytoplazem ve vzorku zpravidla nízké, doporučuje se citlivost PCR metody zvýšit metodou nested PCR, kdy produkt reakce PCR slouží jako templát pro následující amplifikaci. Po získání konečného PCR produktu s amplifikovanou DNA patogena lze jednotlivé druhy fytoplazem rozlišit pomocí analýzy RFLP (Restriction fragment length polymorphism, délkový polymorfismus restrikčních fragmentů). Jedná se o metodu, která identifikuje a charakterizuje jednotlivé druhy fytoplazem pomocí štěpení fytoplazmózní DNA speciálními enzymy (restrikční endonukleázy) s následnou elektroforetickou analýzou produktů štěpení.

Nároky na technické a materiální vybavení: centrifuga s vortexem (nebo zvlášť), termocyklér, pipety, mikrozukmavky, špičky, přístroj na elektroforetickou separaci (elektroforéza), UV transiluminátor s fotoaparátem

Chemikálie: vyizolovaná DNA, Combi PPP Master Mix, primery, PCR voda



1. Pipety se špičkám. 2. Centrifuga s vortexem. 3. Termocyklér. 4. PCR voda, Combi PPP Master Mix, pracovní roztoky primerů,

Izolace DNA: Hlavním předpokladem úspěšné PCR amplifikace je izolace celkové DNA z rostliny v dostatečné kvalitě. Dostupných metod pro extrakci DNA je celá řada a jejich výběr závisí především na matici vzorku, ze kterého má být DNA izolována.

Průběh PCR: K denaturované DNA – tedy k DNA, jejíž dvouřetězec se roztoupil do dvou jednořetězců, přidáme jeden pár specifických primerů, které jsou svými sekvencemi konstruovány specificky k sekvencím diagnostikované fytoplazmy. Tyto primery se vyznačují komplementaritou

k řetězcům DNA fytoplazmy a vážou se pouze na ně. Po jejich navázání působí termostabilní enzym přítomný v reakci (Taq DNA polymeráza) tak, že dosyntetizuje druhý řetězec do formy dvouřetězce. Celý proces je možno rozdělit do tří úseků: *Denaturace DNA* na 2 jednořetězce; *Annealing* – navázání primerů na každý z jednořetězců; *Syntéza druhého řetězce a vytvoření dvouřetězce (extenze)*. Poté následuje opět *denaturace, nové navázání primerů, nová syntéza* druhého řetězce, díky které vzniknou ve finální fázi 4 dvouřetězce. Počet cyklů bývá 30 – 40.

K jednotlivým fázím cyklu (tj. denaturace, navázání primerů, syntéza druhého řetězce) dochází v jedné zkumavce pouhou změnou teploty v naprogramovaném přístroji – termocykléru.



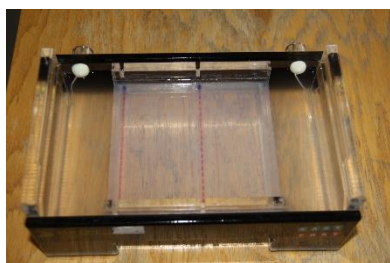
Vlevo: Příprava DNA a mikrozkušavek pro PCR reakci: na snímku dole mikrozkušavky vzorků DNA, PCR voda (lahvička), kterou bude DNA naředěna; na snímku nahoře připravené nadepsané mikrozkušavky, ve kterých proběhne PCR Vpravo: Centrifuga, ve které jsou mikrozkušavky s reakční směsí a DNA

Složení reakční směsi: V reakční směsi jsou již od začátku reakce přítomny všechny komponenty: vyizolovaná DNA, pufr, směs nukleotidů (stavební kameny reakce), primery, polymerázu, Mg²⁺. Celý proces syntézy daného úseku DNA probíhá „sám“ za stanovených cyklických změn teplot. Ve VŠÚO Holovousy s.r.o. se využívají tzv. Master Mixy, které již všechny složky kromě primerů obsahují. Primery se do reakční směsi přidávají dle komplementarity k detekovanému patogenu.

Teplotní podmínky direct a nested PCR

Teplotní podmínky PCR při detekci fytoplazem		Fáze PCR
Direct	nested	
1 cyklus: 94°C 2 min	1 cyklus 95°C 2 min	Počáteční denaturace
35 cyklů: 94°C 1 min	35 cyklů: 95°C 1 min	Denaturace
50°C 2 min	55°C 1 min	Nasedání primerů
72°C 3 min	72°C 1 min	Prodlužování řetězce
1 cyklus: 72°C 10 min	1 cyklus: 72°C 10 min	Dosyntetizování řetězců

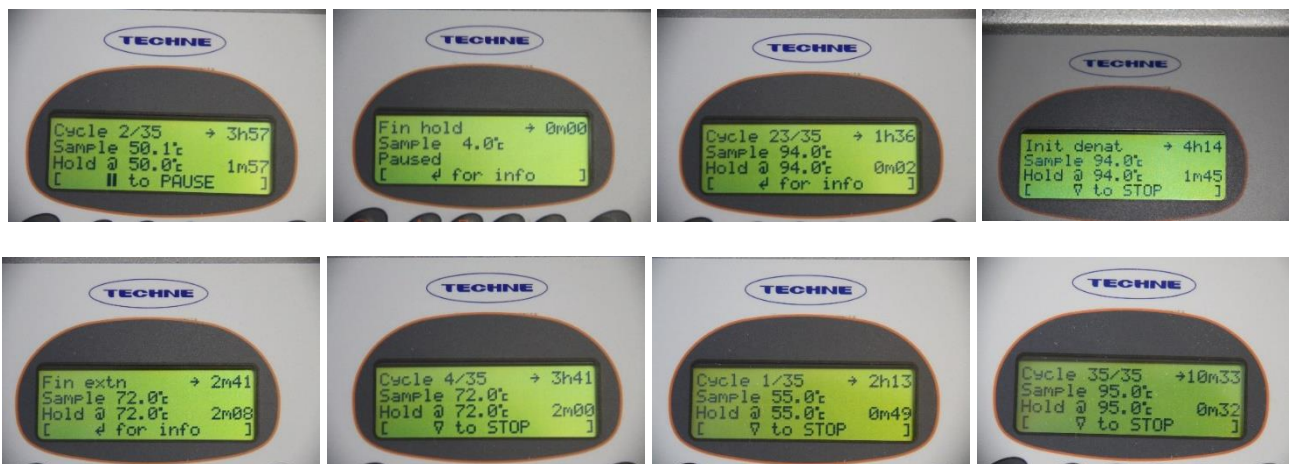
Vyhodnocení PCR produktu: Nejpoužívanější a nejjednodušší metodou detekce produktu po PCR je elektroforetická separace PCR produktu na gelu (agarózový, polyakrylamidový). Princip metody je založen na pohybu záporně nabitých molekul DNA (díky záporně nabitým fosfátovým skupinám) v elektrickém poli směrem k anodě. Elektroforéza probíhá nejčastěji v gelu tvořeném agarózou či polyakrylamidem. Gel tvoří separační síť polymerních molekul s póry, jimiž se molekuly DNA pohybují různou rychlostí v závislosti na velikosti (velké fragmenty se pohybují pomaleji, tj. urazí na gelu kratší vzdálenost) a tím dochází k jejich separaci. PCR produkty jsou na gel nanášeny s fluorescenčním barvivem (např. Syber Green), díky kterému jsou na gelu pomocí UV záření v transiluminátoru zviditelněny fragmenty DNA pozitivních vzorků.



Zleva: Agarózový gel s nanesenými produkty PCR, připravený na elektroforetickou separaci. V elektroforéze probíhající elektroforetická separace produktů PCR. Agarózový gel vložený do UV transiluminátoru.

Kontrolní otázky

1. Jak se jmenuje přístroj, ve kterém probíhají jednotlivé fáze PCR ?
2. Kterou metodou můžeme zvýšit citlivost PCR metody?
3. Vyjmenujte jednotlivé fáze PCR.
4. Na jakém principu je založena elektroforéza ?
5. Pomocí které metody se dají charakterizovat jednotlivé druhy fytoplazem ?
6. Kolik molekul DNA se dá teoreticky získat z výchozí jedné molekuly DNA po 5 cyklech PCR?
7. Na základě uvedených údajů na displeji termocykléru u jednotlivých obrázků určete, která fáze PCR reakce právě probíhá. K určení využijte tabulku č. 1.



RT-PCR

V praxi se bohužel setkáváme s tím, že ovocné výsadby jsou napadány nejrůznějšími druhy patogenů nebo hmyzem. Tyto biotické faktory mohou následně mít negativní vliv na kvalitu, výnos a skladovatelnost plodů. V případě některých patogenů nakonec může docházet k úhynu celých stromů, což se může následně vyústit v ohrožení celých výsadeb.

Důležitost kontroly zdravotního stavu jak množitelských materiálů, tak i samotných výsadeb, je tedy zřejmá. Přitom možnosti testování přítomnosti patogenních organismů jsou v současné době poměrně široké, a to od bylinných indikátorů přes imunoenzymatické metody až po metody molekulárně genetické. Prostřednictvím publikací anebo finalizovaných komerčních produktů jsou dnes nabízeny stále nové metody a přístupy, přičemž celý tento proces lze shrnout jakožto neustále pokračující snahu vyvíjet metody, které budou poskytovat zlepšení alespoň v jednom z parametrů z okruhu cena – rychlost – účinnost – dostupnost pro praxi. Výrazný pokrok v oblasti molekulární genetiky v posledních 30 letech přinesl to, že v oblasti inovací pro detekci rostlinných patogenů se jedná o nejsilnější proud a i dnes jsou velmi rychle představovány stále nové možnosti a přístupy.

Většina z nových přístupů pro detekci virových patogenů, ať už přímo nebo nepřímo, využívá princip namnožení cílového úseku DNA prostřednictvím principu PCR. Metoda PCR však byla obecně vyvinuta tak, že pracuje pouze s molekulami DNA. Vzhledem k tomu, že většina virových patogenů významných pro české ovocnářství má genom kódovaný v RNA, mohlo by se zdát použití PCR pro detekci tohoto okruhu patogenů jako nemožné. To ale naštěstí není pravdou vzhledem k existenci procesu tzv. reverzní transkripce. Reverzní transkripce byla objevena v roce 1970, přičemž enzymy provádějící přepis molekuly RNA na komplementární molekulu DNA označujeme jakožto reverzní transkriptázy. Zařazením reverzní transkriptázy do protokolu pro detekci virových patogenů dojde k přepisu genomové RNA těchto patogenů na jednořetězcové molekuly DNA (označovány jakožto cDNA jakožto zkratka z anglického „complementary DNA“). Tímto poměrně nenáročným krokem získáváme molekulu, která odráží specifickou genetickou informaci daného patogenu a přitom funguje v rámci PCR jakožto vstupní templát. Zařazením tohoto kroku tak může být naplno využit jedinečný potenciál PCR spočívající v jeho vysoké citlivosti a specifitě vůči

vybranému patogenu. Okruh metod využívajících reverzní transkripci s následným využitím takto získaného templátu v PCR označujeme jako RT-PCR.

Nároky na technické vybavení laboratoře:

Při identifikaci rostlinných virů některou z molekulárně genetických metod je obvyklou podmínkou manipulace s izolovanou RNA, neboť genetická informace převážné většiny virových patogenů hospodářsky významných pro české ovocnictví je uložena ve formě RNA molekul. V praxi to přináší výrazně vyšší nároky na čistotu a sterilitu, než je tomu při práci s DNA. Důvodem je všudypřítomnost poměrně stabilních tzv. RNáz, které např. lidské tělo produkuje v rámci prevence proti napadení mikroorganismy. Proto se velmi lehce přihodit, že při nedodržení níže popsanych zásad několik molekul RNáz např. z naší kůže nechtěně skončí v analyzovaném vzorku. V takovém případě hrozí nebezpečí velmi rychlé degradace všech molekul RNA, tedy i té pro nás zásadní - virové.

Mezi základní opatření pro práci s RNA potom tedy patří:

- Používané roztoky by měly být připraveny z DEPC vody (tzn. z vody ošetřené diethylpyrokarbonátem) anebo by měly mít „RNase free“ certifikát přímo od výrobce.
- Laboratorní plast – nejjednodušší je certifikovaný od výrobce; manipulace pouze v bio-hazard boxu; je možné i ošetření vybranými chemikáliemi (0.1 – 0,02 % DEPC; 100 mM NaOH + 1 mM EDTA). V případě špiček na pipety pro přípravu roztoků i při samotné RT-PCR vždy používat špičky s filtrem.
- Laboratorní sklo (mytí jako např. pro tkáňové kultury, poté žíhání v horkovzdušném sterilizátoru při 180°C po dobu 8 h).
- Laboratorní přístroje (vysoké nároky na čistotu, omytí speciálními roztoky proti RNázám jako např. RNazap aj.)
- Laboratorní pracovník (čistota manipulačního prostoru, organizace práce minimalizující počet operací, rukavice, minimalizace pohybů nad otevřenými roztoky)
- Izolovanou RNA lze stabilizovat přidávkem komerčně dodávaných reagentů, které by neměly interferovat s dalším použitím vzorku (např. RNase OUT)
- Základní operace v rámci RT-PCR protokolu provádíme ve sterilním, nejlépe Bio-hazard boxu (ředění PCR všech složek PCR reakce včetně primerů, reverzní transkripce, PCR)

Nároky na RT-PCR z hlediska přístrojového vybavení jsou již obdobné jako nároky na vybavení laboratoře pro PCR, přibývá zde pouze potřeba bio-hazard boxu (viz výše).

Stručný laboratorní postup

1. **Izolace RNA.** Vhodný způsob izolace RNA je pro úspěšnou detekci vybraného virového patogena zcela zásadní. Je možné si připravovat roztoky v rámci dané laboratoře, v dnešní době jsou ale řadou firem nabízeny sady pro izolaci rostlinné RNA, které při dodržení dodavatelem doporučeného postupu poskytují vysoký výtěžek RNA při její nízké degradaci. Mezi nejvíce používané produkty patří izolační sady na celkovou RNA firem Qiagen, Sigma-Aldrich anebo Macherey Nagel. Co se týče pletiva používaného pro izolaci RNA se u dřevin nejčastěji jedná o volbu mezi listovými pletivy nebo zelenými pletivy seškrábanými z víceletých řízků, popřípadě jejich směs.
2. **Reverzní transkripce RNA na cDNA.** Reverzní transkrip-tázu nabízí téměř každá větší společnost zabývající se produkcí enzymů používaných v molekulární genetice. Nabízené reverzní transkriptázy jsou nejčastěji rekombinantní enzymy odvozené z M-MLV (z anglického “Moloney murine leukemia virus”) a AMV (z anglického “Avian myeloblastosis virus”). Začátek přepisu na cDNA je podobně jako u PCR vymezen krátkým oligonukleotidem – tzv. primerem. Nejčastěji se jakožto primer používá zcela náhodná směs oligonukleotidů (obvykle o délce 6 bází), které zcela náhodně hybridizují se



Na obrázku je vyobrazen tzv. kit pro izolaci RNA, soubor reagentů a 2 kolon. Modrá kolona slouží k filtraci roztoku, červená kolona obsahuje křemíkovou membránu, na kterou je RNA navázána a následně vymyta.



všemi molekulami RNA, které se ve vzorku nacházejí. Přes zdánlivou nevýhodnost tohoto přístupu založeného na náhodě však obvykle funguje velmi dobře a navíc umožňuje po jedné reverzní transkripci použít tento templát pro identifikaci vícero virů popř. zařazení vnitřní pozitivní kontroly.

3. **PCR.** Při identifikaci virových patogenů za použití PCR je nejzásadnější volba vhodných PCR primerů, které budou splňovat obvyklé požadavky na PCR primery a přitom budou specifické pouze ke genomu sledovaného patogenu. Co se týče výběru oblastí genomu vhodných pro jejich PCR amplifikaci, jsou nejčastěji vybírány geny pro obalový protein. Vzhledem k výše popsané citlivosti RNA k degradaci je také doporučováno, aby pro zamezení falešně negativních výsledků byla u testovaných vzorků provedena PCR zaměřená na amplifikaci úseku některého z housekeeping genů. Přítomnost amplikonu při detekci housekeeping genu vylučuje, že vir byl identifikován v nedegradované RNA a znamená také správnost izolace RNA.

LAMP

LAMP neboli Loop mediated isothermal amplification (česky: izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou) je technika sloužící k detekci patogenní DNA nebo RNA. Pomocí této techniky je možné určit přítomnost patogenů jako jsou viry, bakterie nebo houby v rostlinných pletivech nebo v živočišných tkáních. LAMP je technika, která je prováděna v jediné mikrozkušence. Technika má před sebou pravděpodobně slibnou budoucnost jako tzv. low cost metoda, tedy velmi levná detekční metoda. Primárně tato metoda pracuje s DNA, ale může být kombinována i s reverzní transkripcí a tak mohou být detekovány i RNA patogeny jako jsou rostlinné viry. Momentálně je metoda využívána poměrně hojně v klinické praxi (Mahony et al., 2013), kde již existují optimalizované a plně funkční komerční kity.

Princip metody LAMP

Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o izotermální amplifikaci, tj. že amplifikace nukleových kyselin probíhá za konstantní teploty. Teplota pro metodu LAMP bývá přibližně 60–65 °C. Pro průběh reakce je nutné mít připraven mix, který obsahuje nukleovou kyselinu, 6–8 primerů, speciální polymerázu *Bst*-tato polymeráza je izolována z bakterie *Bacillus stearothermophilus* – polymeráza se vyznačuje tzv. dislokázovou aktivitou, tj. dokáže oddělovat kódující vlákno DNA a nahrazovat ho řetězcem, který sama syntetizuje. Dále reakční mix obsahuje pufr pro polymerázu, $MgCl_2$ – je buď součástí pufru pro polymerázu nebo je nutno tuto látku přidávat samostatně, dNTP-deoxyribonukleotidy, popř. barvivo, které je schopno interkalovat do vznikající dvouvláknové DNA, je možno také přidat např. betain, což je kvartérní amoniová sůl, která může být v reakčním roztoku použita v důsledku velkého počtu GC párů v templátové DNA. Tento mix musí obsahovat rozdrčená rostlinná pletiva, kde je detekována nukleová kyselina patogena.

V principu metody LAMP jde o amplifikaci kontinuální, a to při stálé teplotě kolem 63 °C. Podstatnou složkou jsou zejména speciálně navržené páry primerů pro cílenou amplifikaci požadované části DNA a specifické polymerázy. Zároveň je však možné i použití speciálně navržených loop-primerů, které mohou rychlost amplifikace značně zvýšit. Trvání takové amplifikace může být několikanásobně nižší než u trvání klasické PCR (www.loopamp.eiken.co.jp, 2014). Velkou výhodou je rovněž fakt, že není nutné nákladné vybavení pro amplifikaci nebo detekci produktu, existuje možnost provádět amplifikaci mimo laboratoř a zároveň poskytuje možnost získání řádově více produktu než u PCR. Někteří vědci věří, že izotermální amplifikace je v tomto ohledu elegantní nástroj, umožňující urychlit detekci virů, bakterií nebo hub oproti klasické PCR. Samotný proces amplifikace probíhá v několika fázích.

Fáze LAMP

Při teplotě 63 °C je část DNA denaturovaná. V popisu mechanismu amplifikace dále budeme uvažovat jedno denaturované vlákno. Pro druhé vlákno je popis logicky ekvivalentní. Denaturované vlákno obsahuje cílový úsek, který je ohraničen známými sekvencemi nukleotidů, pro něž jsou primery navrženy. Takových cílových úseků se v DNA nachází většinou 6 – 8. Tyto primery jsou dále popsány jako FIP, BIP, F3 a B3, kde FIP a BIP, tedy přední a zadní vnitřní primer a F3 a B3 jako

přední a zadní vnější primer (FIP – Forward Inner Primer, BIP – Backward Inner Primer). Amplifikace je tedy akcelerována-urychlena loop primery (loop – smyčka), tedy Loop B a Loop F. Na první vlákno nasedá (hybridizuje) při dané teplotě BIP primer. Polymeráza dosyntetizuje komplementární řetězec. Jelikož BIP primer se skládá z B2 komplementární části nasedající na řetězec a nekomplementární B1C části, která na řetězec nenasedá (Obrázek 1), avšak je komplementární k části nově syntetizovaného řetězce, může být tento řetězec oddělen od templátového řetězce navázáním B3 primeru a dislokázní aktivítě polymerázy, která od B3 primeru syntetizuje dělicí vlákno.

Oddělené vlákno začíná BIP sekvencí a vlivem dostatečné délky BIP sekvence dochází ke stočení tohoto konce, kde jak už bylo řečeno, nekomplementární část BIP primeru B1C je komplementární k nově syntetizované části DNA a mezi těmito částmi dojde ke spárování. Na nově syntetizovaný řetězec poté nasedá FIP primer a F3 primer a celý proces je ekvivalentní. Výsledkem je produkt cílové sekvence nukleotidů, ohraničený stočenými konci, smyčkami (loop). Oranžová šipka (Obrázek 2) naznačuje směr syntézy dalšího komplementárního vlákna, přičemž daný oblouk B2C (Obrázek 2) je jednovláknový a tudíž vhodný k navázání BIP primeru (Obrázek 3).

DNA polymeráza vázící se na BIP primer syntetizuje ve směru šipky komplementární vlákno k zelenému vláknu (Obrázek 3). Oranžové vlákno je tímto procesem postupně oddělováno a v důsledku komplementarity jeho F1 a F1C sekvencí dochází k jeho stočení a vytvoření smyčky. Z této F1 sekvence je syntetizován nový řetězec.

Opět si všimněme (Obrázek 4) komplementární jednovláknové F2C produktu části k FIP primeru. FIP primer na F2C úsek produktu nasedá a následně je syntetizováno nové vlákno ve směru zelené šipky. Přitom dochází k postupnému oddělování vlákna a jeho stočení. Toto vlákno je označeno oranžovou šipkou (Obrázek 4). Výsledek je znázorněn na obrázku níže.

V této fázi je syntetizováno nové vlákno ve směru zelené šipky (Obrázek 5), kde zelená šipka náleží původně oddělenému a stočenému vláknu (viz Obrázek 4, vlákno označené oranžovou šipkou). Výsledkem jsou dva produkty s cílovou sekvencí nukleotidů, které dále podléhají amplifikaci, neboť při tomto kroku dochází úplnému rozdělení produktu na dva dílčí produkty. Takto postupně geometrickou řadou vznikají nové produkty podléhající amplifikaci. Oba produkty jsou znázorněny na obrázku níže (Obrázek 6).

Amplifikace dále pokračuje na základě výše popsanych mechanismů. Na výše uvedeném Obrázku 6 je znázorněna možnost, kdy loop primery hybridizují na druhý produkt. Loop-primery jsou komplementární k úseku mezi B1C a B2, resp. F1C a F2 produktu. Zvyšují tak počet výchozích pozic pro amplifikaci DNA. Amplifikace tohoto produktu by mohla pokračovat bez této hybridizace, avšak díky loop-primerům vzniká extra produkt, který poslouží k rychlejšímu průběhu amplifikace.

Izotermální amplifikace se provádí nejčastěji v objemu 25 μ L při teplotách 60 – 65°C. V závislosti na počtu použitých primerů trvá doba reakce 30 – 60 min. Koncentrace primerů FIP a BIP bývá zpravidla rozdílná a to například 1,6 M, u F3 a B3 0,2 M a Loop F a Loop B 0,8 M. Koncentrace *Bst* polymerázy může být např. 8 U (Los, 2012).



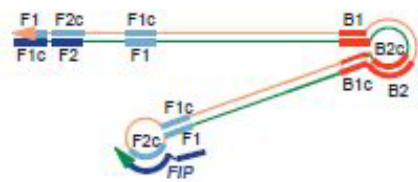
Obrázek 1. Nasednutí BIP a B3 primerů (Los, 2012)



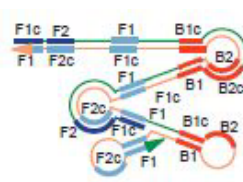
Obrázek 2. Výchozí produkt pro LAMP (Los, 2012)



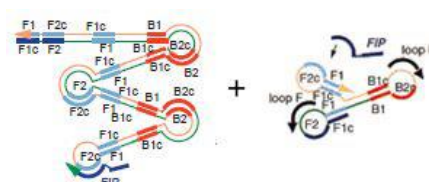
Obrázek 3. Nasednutí BIP na výchozí produkt LAMP (Los, 2012)



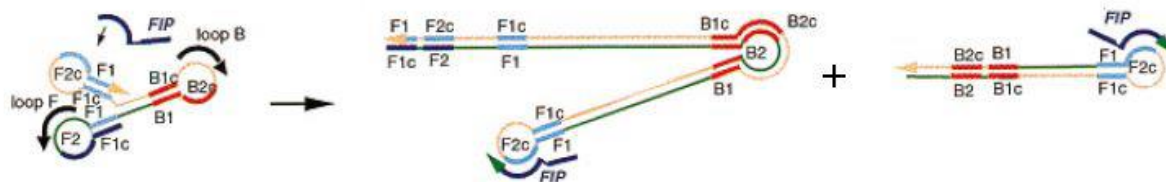
Obrázek 4. Průběh amplifikace po syntéze vlákna z BIP a sednutí FIP (Los, 2012)



Obrázek 5. Výsledný produkt syntézy FIP vláknů (Los, 2012)



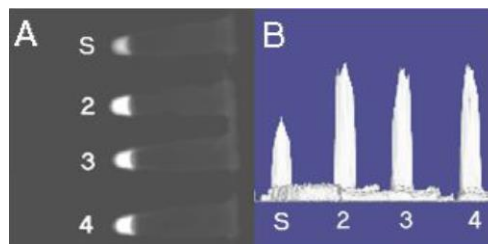
Obrázek 6. Vznik dvou nezávisle amplifikovatelných produktů (Los, 2012)



Obrázek 7. Amplifikace za přítomnosti loop primerů, druhý z produktů vznikl z loop B primeru (Los, 2012)

Detekce produktu LAMP

Koncentrace produktu se pohybují v rozmezí 400–800 µg/mL, což umožňuje jeho snazší detekci různými metodami. První metodou je gelová elektroforéza v agarovém gelu. Jedná se o levný způsob detekce, avšak nevýhodou je její relativně vysoká časová náročnost, probíhá až po skončení LAMP a výsledný produkt nelze kvantifikovat ani kvalifikovat. Další metodou je turbidimetrie. V průběhu LAMP vzniká sraženina magnéziium-pyrofosfátu, která může být detekována turbidimetrem nebo spektrofotometrem a to po skončení LAMP. Je to rychlý způsob detekce, ale není kvantitativní a kvalitativní. Vzhledem k nutnosti detekčních přístrojů se jedná i o drahý způsob detekce. Alternativu představuje centrifugace, po níž se sraženina pyrofosfátu usadí na dně reakční nádoby a může být snáze detekována pouhým okem, což je do značné míry dosti subjektivní způsob detekce. Vznik pyrofosfátu lze detekovat také v průběhu reakce, hovoříme o tzv. Real-Time turbidimetrii. Výhodou je možnost kvantifikovat vzniklý produkt. Dalším způsobem detekce je použití DNA barviv a pozorování fluorescence reakčního roztoku. Jedná se o rychlý způsob, který může být proveden i bez použití fluorimetru a to pouhým okem, za použití vhodného DNA barviva, což je výhodné pro rychlou detekci a finanční nenáročnost. Pomocí Real-Time fluorimetrie lze vzniklý produkt taktéž kvantifikovat. Kvalifikovat produkt lze pomocí systému enzymové imunoanalýzy (Lateral Flow System). Jedná se o poměrně rychlou a levnou metodu. Posledním způsobem detekce je tzv. ABC-LAMP (Alternately Binding quenching probe Competitive LAMP). Produkt lze rychle kvantifikovat a kvalifikovat, tj. určit specifické sekvence produktu. K tomu je zapotřebí fluorimetru a speciálně navržené sondy. Ta se váže na specifické místo v produktu a snižuje tak jeho fluorescenci (Los, 2012).



Příklad měření fluorescence vzorků po LAMP A) Intenzita fluorescence, vz. S: slepý pokus (blank), vz. 2-4 pozitivní vzorky B) 2D projekce intenzity vzorků S-4 programem GeneSnap (Los, 2012).

Rejstřík odborných pojmů

Amplifikace – množení nukleové kyseliny

cDNA – complementary DNA, DNA prostá intronů

Fluorimetrie – metoda pro měření fluorescenčního signálu

Kit – soubor jednotlivých reagensů, který je navržen za určitým účelem (např. izolace nukleové kyseliny)

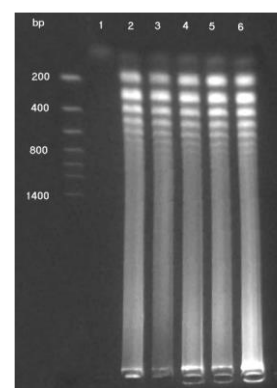
PCR – polymerázová řetězová reakce

Mastermix – soubor reagensů, které je třeba smíchat pro průběh reakce

Turbidimetrie – metoda pro měření kalnosti roztoku

Kontrolní otázky

1. Jaké jsou výhody a nevýhody LAMP oproti PCR?
2. Jakými způsoby lze detekovat produkty LAMP?
3. Jaká je teplota pro průběh LAMP?
4. Z čeho se skládá mastermix pro průběh LAMP?
5. Jaké patogeny je možné detekovat metodou LAMP?



Příklad detekce vzorků po LAMP na agarové elektroforéze. 1 slepý vzorek (blank, vzorek bez DNA) 2-6 pozitivní vzorky. (Los, 2012).



Praktického cvičení - pokus kategorie a - vyžadující běžné vybavení

Pozorování symptomů PPV na rostlině rodu *Prunus*

1. Určete ovocnou rostlinu rodu *Prunus*, nejlépe slivoň, která vykazuje symptomy PPV – plum pox virus, šarka.
2. Od fenofáze rašení pozorujte rostlinu a zapisujte pozorované symptomy během vegetace až do opadu listů.
3. Vyhodnoťte a charakterizujte zapsané symptomy.

U slivoní jsou příznaky viditelné na listech a plodech, výjimečně i na peckách. Na listech se objevují žlutozelené skvrny, proužky popř. kroužky. Okraje skvrn nejsou ostře ohraničené, ale difúzní. Nejlépe jsou příznaky viditelné v květnu a červnu, v pozdním létě se intenzita symptomů zmenšuje. U některých odrůd se skvrny koncem léta zbarvují červenofialově. U velmi náchylných odrůd ('Zelená renklóda') vznikají nekrózy a listy předčasně opadávají. Typický „neštovičný“ povrch plodů vzniká postupným propadáním kroužků a proužků a objevuje se pouze u náchylných odrůd ('Domácí velkoplodá'). Příznaky jsou nejlépe patrné po setření voskového povlaku na povrchu plodů. Dužnina je v místě propadlin červenohnědá a drží na pecce. Postižené plody předčasně opadávají, obsahují méně cukrů i kyselin a jsou většinou bezcenné pro přímý konzum či další zpracování. U méně citlivých odrůd ('Althanova renklóda') se objevují příznaky zejména na listech a na plodech, kde vznikají mapovité kresby. K poškození dužniny, propadání povrchu plodů a předčasnému opadu plodů nedochází (Eichmeier, 2008).

Praktické cvičení - pokus kategorie b - vyžadující určité laboratorní vybavení

Izolace nukleové kyseliny (DNA) jakožto základní krok pro detekci patogenů

1. Připravte banán, oloupejte ho, navažte 1g. Připravte dvě kádinky a jednu zkumavku, připravte roztok soli a šampon (mýdlo). Šampon (mýdlo) musí obsahovat EDTA. Dbejte na důkladné rozmačkání banánu a promíchání směsi.
2. Po odstátí a oddělení zkumavky dolít co nejvíce podchlazeným lihem. Bílá vláknitá sraženina stoupající z dolní „zamlžené“ fáze (filtrát) do horní průhledné fáze (líh) je DNA (obsahující některé jaderné proteiny, případně jiné molekuly s podobnými chemickými vlastnostmi jako DNA).
3. Vysvětlení: Po chemické stránce je DNA lineární makromolekula, jejíž dva komplementární řetězce jsou k sobě připoutané vodíkovými můstky. DNA může být z vodného roztoku vysrážena (vysrážena) ethanolem. Vlastností DNA by bylo možno samozřejmě vyjmenovat mnohem víc, nicméně právě výše uvedené využijeme k izolaci. Když do rozmačkaného banánu nalijeme roztok šamponu s EDTA s vodou a solí, sledujeme tím vlastně několik kroků. Detergenty obsažené v šamponu proděraví a vysráží buněčnou membránu banánu a také některé proteiny. EDTA inhibuje proteiny obsahující kovy, z nichž jsou některé schopné poškodit DNA. Sůl se přidává kvůli zachování osmotického tlaku roztoku. Voda je reakčním prostředím a mimo jiné látkou, ve které je DNA rozpustná. Následnou filtrací se odstraní všechny látky, které jsou nerozpustné ve vodě. Do filtrátu projde kromě DNA i řada dalších látek z původní buňky, ale i sůl a některé složky šamponu. Podchlazený líh se přilévá, protože se za nižší teploty méně mísí s vodou. DNA se vysráží (precipituje) a vyplave do horní, lihové fáze. V lihu je nerozpustná.

Praktické cvičení - pokus kategorie c - možno realizovat po dohodě pouze na specializovaných pracovištích

Detekce viru PPV v cDNA izolované z pletiv rostlin rodu *Prunus*

1. Detekce v oblastech genomu, které kódují obalový protein, jsou ve virologii nejčastější. Dle zásad pro metodu PCR připravte reakční mix: voda (HPLC čistota), 1× pufr pro polymerázu (Promega, USA), 10mM dNTPs (Invitak, Německo), 1U DNA polymeráza (Promega, USA) a z obou primerů. Celkový obsah reakčního mixu je 20 µl. K reakci přidejte 2 µl již připravené cDNA (RNA po reverzní transkripci). Dopočítejte jednotlivé objemy reagentů. Teplotní program pro tuto reakci: úvodní denaturace 95 °C po dobu 5 minut, dále 95 °C po dobu 30s,



55 °C po dobu 40 s a 72 °C po dobu 45 s, tento cyklus opakovat 40×, potom následuje finální annealing (prodlužování) 72 °C po dobu 7 minut. Tento program je třeba nastavit v speciálním přístroji – termocykleru.

2. PCR musí být provedena pro vzorky, ve kterých detekujeme patogenní cDNA, pro pozitivní kontrolu (100% obsahuje patogenní cDNA), negativní kontrolu (cDNA rostliny bez patogenní cDNA) a blank (reakce bez templátu).
3. Produkty PCR reakce separujte na agarózové elektroforéze. Agarózový gel namíchejte 1% a umístěte v elektroforéze v TAE pufru 1×. Separální podmínky: Elektroforetická separace probíhá při napětí 112 V, což odpovídá spádu napětí 3,5 V.cm⁻¹. Trvání separace 1 hodina. Gel následně přemístěte na transiluminátor, prosvitěte UV zářením a výsledek zdokumentujte pomocí digitálního fotoaparátu. Vyhodnoťte zdali jsou Vaše vzorky PPV pozitivní nebo negativní (tzv. End-point detekce).

Literatura

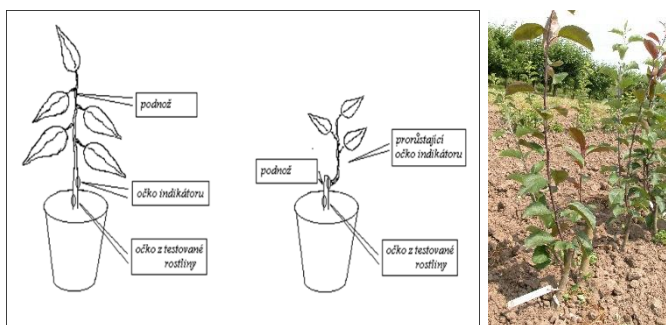
- Eichmeier A. 2008. Sledování pohybu viru šarky švestek v rámci rostliny a fenologických fází pomocí RT-PCR. Diplomová práce, Mendelova univerzita v Brně, 91 stran.
- Eiken Chemical Co.,Ltd.:The principle of LAMP method [online]. [cit. 13-8-2014]. Dostupné z <http://www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>
- Los J., 2012. Detekce nežádoucích mikroorganismů pomocí izotermální amplifikace DNA. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 49 stran.
- Mahony J., Chong S., Bulir D., Ruyter A., Mwawasi K., Waltho D. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *Journal of Clinical Virology*. 2013; 58:128–131.

Biologické testy na dřevinných indikátorech

Princip metody testování přítomnosti virů a fytoplazem na dřevinných indikátorech je založen na viditelné reakci indikátorové rostliny na patogen, který je naočkován na podnož spolu s indikátorem. Virová infekce je v počátečním stádiu latentní, postupně po namnožení a zvýšení koncentrace viru v rostlině se může projevit šokovou fází, kdy u některých chorob dochází k typickému projevu, tzn. ke vzniku příznaků, které mohou být charakteristické pro jednotlivé choroby. Systematické infekce se u bylin vyvíjejí rychle, ale u ovocných stromů může šíření viru v rostlině trvat i roky. Tato skutečnost komplikuje výběr diagnostické metody a vlastní výběr reprezentativního vzorku pro testování ovocných kultur nejen biologickými ale i laboratorními metodami jako jsou ELISA a PCR. Laboratorní testy slouží především pro rychlé vyloučení nemocných rostlin nebo jako rychlý orientační test výchozích matečných materiálů v matečnicích a množárnách roubů. Zatím však nelze ničím nahradit specifické testy na dřevinných indikátorech, jak je předepisují materiály a publikace ISHS a EPPO, které jsou doplňovány o nové poznatky pracovní skupinou EPPO. Pro účely diagnostiky biologickým indexingem byly vyselektovány citlivé druhy a kultivary ovocných a okrasných dřevin. Pokud dojde k infekci takovéto citlivé rostliny, patogen se v ní množí a dosahuje vysokých koncentrací na úkor životaschopnosti rostliny. Vyvolané onemocnění se projevuje výraznými symptomy, které způsobují poškození rostliny, někdy i s následkem úhynu. V plně testovací školce je patogen inokulován na podnož metodou dvojitého očkování testované rostliny. Po té je po dobu následujících 2 vegetačních období prováděno hodnocení a monitoring výskytu symptomů a specifických reakcí indikátorů. Hodnocení zdravotního stavu testovaných rostlin je prováděno na základě výsledků monitoringu specifických příznaků virových a fytoplazmových chorob na indikátorových rostlinách

Pracovní postup: Pro účel biologického indexingu na dřevinných indikátorech je používána metoda dvojitého očkování. Nejprve je na podnož naočkován indikátor (ve výšce 12 – 15 cm nad zemí)

a po 14 dnech je pod očko indikátoru ve výšce 5–8 cm nad zemí naočkováno očko z testované rostliny. Testovací rostlina (podnož + očko indikátoru + očko testované rostliny) je zakládána ve 3 až 5 opakováních. Jako negativní kontrola slouží samotný indikátor, který je naočkován na podnož také ve 3 až 5 opakováních. Růst indikátoru je regulován slabším řezem a jeho dominance je udržována pomocí silnějšího řezu testované rostliny (vyrůstající ze spodního oka) a řezem podnože. Objektivní hodnocení přítomnosti příznaků infekce je možné porovnáním rostlin negativní kontroly s testovacími rostlinami. Prohlídka testovacích rostlin je během vegetace (od května do října) prováděna několikrát, optimálně třikrát. Symptomy, jako jsou mozaiky a epinastie, se výrazně projevují hlavně na mladých listech a výhonech indikátorů, zejména na začátku jejich vegetačního období v období rašení. Specifické příznaky některých testovaných patogenů se projevují v jiné fázi vegetačního období (např. Little cherry disease vyvolává předčasné červenání listů indikátoru Canindex během července a srpna). Období, ve kterém je prováděno sledování příznaků, nesmí být kratší než 2 vegetační období následující po inokulaci. Pokud jsou na indikátorových rostlinách zaznamenány během hodnocení specifické symptomy, je testovaná rostlina inokulovaná na podnož pod indikátorovou rostlinou (spodní očko) vyhodnocena jako pozitivní.



Zleva: Schématické znázornění založení testu na dřevinném indikátoru. Testovací rostliny ve školce: vrchní výhon - indikátor, spodní výhon - testovaná rostlina.

Projev symptomů hospodářsky významných virových chorob na indikátorových rostlinách

Onemocnění virové neštovice slivoně vyvolané původcem *Plum pox virus* (PPV): chlorotické mozaiky na listech indikátorů 'GF 305' a 'Shiroplum'

Hlavními příznaky onemocnění fytoplazmová proliferace jabloně (apple proliferation) na indikátoru 'Golden Delicious' jsou metlovitost výhonů, zvětšené palisty a chloróza listů, které mohou být menší a protáhlé.

Fytoplazmové chřadnutí hrušně (pear decline) se na indikátorových rostlinách *Pyronia veitchii* projevuje svinováním a předčasným zbarvením listů do červena a končí následným odumřením indikátoru.



1.-2. Symptomy infekce PPV: chlorotické mozaiky na listech indikátorů 'GF 305' (snímek vlevo) a 'Shiroplum' (snímek vpravo). 3.-4. Příznaky onemocnění fytoplazmové proliferace jabloně (apple proliferation) na indikátoru 'Golden Delicious'. 5.-6. Symptomy fytoplazmového chřadnutí hrušně na indikátoru *Pyronia veitchii*