národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika diagnostiky virů rodu Vitivirus v rostlinách révy vinné v ČR

Komínek, Petr
2011

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-112754

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 11.07.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

ing. Petr Komínek, Ph.D.

Metodika diagnostiky virů rodu Vitivirus v rostlinách révy vinné v ČR

METODIKA PRO ÚTVARY STÁTNÍ SPRÁVY

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 2011

Metodika pro útvary státní správy
Metodiku schválilo Ministerstvo zemědělství ČR a doporučilo její využití v zemědělské praxi

Autor:
ing. Petr Komínek, Ph.D.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507
161 06 Praha 6 - Ruzyně

Název:
Metodika diagnostiky virů rodu Vitivirus v rostlinách révy vinné v ČR

Jména oponentů:
Ing. Gabriela Schlesingerová, Ph.D.
Státní rostlinolékařská správa Olomouc

Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.
Česká zemědělská univerzita v Praze

Dedikace:
Metodika vznikla za podpory MZe ČR v rámci řešení výzkumného záměru MZE0002700603.

ISBN: 978-80-7427-029-1

Obsah: **strana číslo**

I. Cíl metodiky 3
II. Vlastní popis metodiky
Úvod 3
1. Vybavení a chemikálie 4
1.1. Přístrojové zabezpečení 4
1.2. Materiál 4
1.3. Chemikálie a kity 5
1.4. Příprava roztoků 6
2. Odběr a příprava vzorků 8
3. Test RT-PCR 9
3.1. Izolace RNA 9
3.2. RT-PCR 10
3.2.1. Test na přítomnost GVA 10
3.2.2. Test na přítomnost GVB 12
4. Test ELISA 13
4. 1. Potažení destiček protilátkami 13
4. 2. Nanesení testovaných vzorků 13
4. 3. Pozitivní a negativní kontrola, blank 13
4. 4. Protilátky značené enzymem 13
4. 5. Enzymatická reakce 14
4.6. Určení pozitivní reakce 15
Seznam obrázků v metodice 15
III) Srovnání novosti postupů 16
IV) Popis uplatnění certifikované metodiky 16
V) Ekonomické aspekty 16
a) vyčíslení nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice 16
b) vyčíslení ekonomického přínosu pro uživatele 16
VI) Seznam použité související literatury 17
VII) Seznam publikací, které předcházely metodice 17

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je stanovit přítomnost virů rodu Vitivirus v rostlinách révy vinné s využitím dvou nezávislých metod.

II. Vlastní popis metodiky

Úvod

Metodika popisuje postup detekce dvou významných virů rodu Vitivirus napadajících révu vinnou.
Jde o tyto dva viry:
A virus révy vinné - Grapevine virus A - GVA
B virus révy vinné - Grapevine virus B - GVB

Tyto dva viry způsobují u révy vinné poruchy růstu, které se projevují nejvíce na srůstu podnože a naštěpované odrůdy. Tím dochází ke snižování toku živin a asimilátů mezi podzemní a nadzemní částí rostliny, snižování životaschopnosti keře a tím i k snižování výnosů. Extrémním případem je inkompatibilita podnože a naštěpované části, kdy naštěpovaná část přiroste jen málo a nadzemní část rostliny během tří let zcela odumírá. Příznaky virové infekce se na listech napadených rostlin většinou neprojevují.
Přítomnost těchto virů v rostlinách révy vinné lze testovat snadno dostupnými metodami ELISA nebo RT-PCR. Test ELISA je levnější, ale méně citlivý. Ve většině případů však pro stanovení přítomnosti jmenovaných virů postačuje. Test RT-PCR je dražší, většinou však také citlivější (Komínek et al., 2009). Používáme ho také pro potvrzení sporných výsledků testu ELISA.

Požadavky na zdravotní stav množitelského materiálu jsou dány zákonem č. 219/2003 Sb. a navazující vyhláškou č. 332/2006Sb, které zapracovávají i příslušné předpisy Evropských společenství. Dle této platné legislativy je povinné testování množitelského materiálu révy na GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3 a u podnožové révy ještě GFkV. Testování na GVA a GVB tedy není povinné, ale můžeme ho doporučit zejména při podezření na virovou inkompatibilitu.

Podle našich dlouholetých zkušeností je níže uvedený postup nejspolehlivější způsob detekce GVA a GVB v rostlinách révy vinné.
Metoda ELISA je méně citlivá ve srovnání s RT-PCR a v některých výhonech infikovaných rostlin révy nemusí zachytit přítomnost viru. U RT-PCR jsme tyto problémy nepozorovali, přesto je nutné dodržet námi doporučený postup a používat průměrný vzorek z více částí testované rostliny.
Co se doby odběru týče, nebyly pozorovány rozdíly ve spolehlivosti detekce při odběru na začátku, v průběhu nebo na konci dormance.
Ke křížovým reakcím v ELISA nebo v RT-PCR u těchto virů nedochází.

1. Vybavení a chemikálie

1.1. Přístrojové zabezpečení

PCR

- termocykler (např. PTC200 od MJ Research)
- mrazicí boxy -80 °C a -20 °C
- dokumentační systém (pracoviště virologie VÚRV je vybaveno dokumentačním systémem ChemiGeniusQ od SynGene, lze pořídit i levnější řešení s cenou do 100 tis. Kč)
- digestoř nebo laminární box
- chladnička (+4 °C)
- autokláv
- vodní lázeň
- třecí misky s tloučky
- vortex (mikrotřepačka)
- centrifuga na mikrozkumavky (není zapotřebí chlazená, otáčky nastavitelné do 15 000 rpm; s možností odstřeďovat mikrozkumavky objemu 0,5 a 2,0 ml)
- sada mikropipet (0,5–10 µl, 2–20 µl, 20–200 µl, 200–1000 µl)
  silně doporučujeme používat několik oddělených sad pipet: jedna sada pro izolaci RNA, druhá sada pro pipetování reakčních směsí (premix PCR), třetí pro pipetování vzorků a čtvrtá pro pipetování PCR produktů
- pH-metr
- laboratorní váhy
- horizontální elektroforéza + zdroj
- mikrovlnná trouba
- výrobník ledové tříště

ELISA

- chladnička (+4 °C)
- pH-metr
- laboratorní váhy
- sada mikropipet (0,5–10 µl, 20–200 µl, 200–1000 µl)
- osmikanálová pipeta 20–200 µl
- ruční homogenizátor Bioreba, katalog Bioreba 400010 nebo
- elektrický homogenizátor Bioreba Homex6, katalog Bioreba 400005
- promývačka, např. Hydroflex nebo Columbus firmy Tecan
- spektrofotometr, např. OpsysMR firmy Dynex nebo Sunrise firmy Tecan

1.2. Materiál

PCR

- zahradnické nůžky, ostrý nůž
- skalpel s výměnnými čepelemi nebo sterilizovatelný nůž nebo sterilizovatelné nůžky
- role alobalu
- váženky
- stojánky na mikrozkumavky
- filtrační papír, papírové ručníky
- laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, láhve reagenční s uzávěrem – autoklávovatelné)
- třecí misky s tloučky
- 0,5 ml a 2 ml mikrozkumavky
- PCR zkumavky (velikost a typ podle použitého přístroje)
- permanentní popisovač na sklo a na plast
- špičky pro mikropipety + boxy (sterilizovatelné)

- vyšetřovací rukavice

ELISA
- zahradnické nůžky
- ostrý nůž
- skalpel
- role alobalu
- váženky
- homogenizační sáčky pro ELISA, katalog Bioreba 430100b
- laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce)
- špičky pro mikropipety
- mikrotitrační destičky Nunc Maxisorp (dodává např. Loewe http://www.loewe-info.com)
- lepicí fólie na destičky, katalog Alpha LW2697

1.3. Chemikálie a kity

PCR
- RNeasy Plant Mini Kit (50), katalog Qiagen 74904
- OneStep RT-PCR Kit (100), katalog Qiagen 210212
- primery: nutno je nechat nasyntetizovat na zakázku (např. Sigma nebo Generi Biotech)
    - GVA6591F 5´ GAGGTAGATATAGTAGGACCT 3´
    - GVA6862R 5´ TCGAACATAACCTGTGGCTC 3´
    - GvbA 5´ GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC 3´
    - GvbS 5´ AGTAGCCCTTCGTTTAGCCGC 3´
- SeaKem LE Agarose 1 kg, katalog Lonza 50005
- Tris Base, katalog Promega H5131
- Acetic acid, 1l, katalog Sigma 45726-1L-F
- Ethidium bromide 1g, katalog Sigma E8751, **pozor - vysoce toxický, možné nebezpečí nevratných účinků**
- GeneRuler™ 100 bp Plus, katalog Fermentas SM0323
- EDTA, 100g, katalog Sigma E5134-100g
- Ficoll PM 400, 10g, katalog Sigma F4375
- Bromophenol Blue sodium salt, 5g, katalog Sigma B8026-5G
- Xylene Cyanol, 10g, katalog Sigma X4126-10G
- Orange G, 25g, katalog Sigma 03756-25G
- 2-mercaptoethanol, katalog Sigma M3148. **Pozor, 2-mercaptoethanol je toxická látka**!!
- sterilní redestilovaná voda, nebo komerčně dodávaná voda pro PCR
- Ethanol 100% p.a.
- tekutý dusík

ELISA
- **Kit** pro detekci **GVA**, včetně pozitivní a negativní kontroly. Dodává např. Bioreba (http://www.bioreba.com), Agritest (http://www.agritest.it), Sediag (http://www.sediag.com).
- **Kit** pro detekci **GVB**, včetně pozitivní a negativní kontroly. Dodává např. Agritest (http://www.agritest.it), Sediag (http://www.sediag.com).

Doporučujeme kity od firmy Agritest, které používáme na pracovišti virologie VÚRV.

- p- nitrofenylfosfát, Sigma 71768, Loewe http://www.loewe-info.com prodává jako "substrate tablets"
- Diethanolamine, Sigma D8885
- destilovaná voda

Běžné chemikálie, dodává např. P-lab, Lachema, Druchema, příp. Sigma - Aldrich a pod.
- NaCl
- KCl
- $MgCl_2$ x 6 H_2O
- Na_2HPO_4
- KH_2PO_4
- Na_2CO_3
- $NaHCO_3$
- NaOH
- HCl
- NaN_3
- Tris
- PVP K25
- Tween 20
- BSA (bovine serum albumin)

1.4. Příprava roztoků

PCR

0,5 M EDTA 200 ml
37,22 g EDTA prášek
doplnit vodou do 200 ml
upravíme pH pomocí NaOH na hodnotu 8,0

FLB (Ficoll Loading Buffer) 10x, 15 ml

Ficoll 400	2 g
0,5M EDTA (pH 8,0)	1,25 ml
Bromophenol Blue	10 mg
Xylene Cyanol	10 mg
Orange G	20 mg

doplnit vodou do 15 ml

2% agarózový gel
Objem připravovaného agarózového gelu záleží na velikosti vaničky horizontální elektroforézy, kterou máme k dispozici. Podle toho si musí každý uživatel této metodiky přepočítat následující recept: 2 g agarózy nasypeme do 100 ml pufru 1x TAE, směs agarózy a pufru TAE rozehřejeme v mikrovlnné troubě nebo na elektrickém míchadle s ohřevem a ještě horkou nalijeme do vaničky s hřebínkem. Necháme ztuhnout při pokojové teplotě.

50xTAE - zásobní roztok:
242 g Tris baze
57,1 ml kyseliny octové
100 ml 0,5M EDTA (pH = 8,0)
doplníme redestilovanou vodou do 1 litru

1 x TAE - pracovní roztok:
20 ml 50xTAE doplníme redestilovanou vodou do 1 litru.

Ethidium bromid
zásobní roztok: 2,5 mg/1 ml vody
dávkování 4 µl na 100 ml pufru TAE
Ethidium bromid je látka, která se váže na šroubovici nukleových kyselin, kde pak pod UV-lampou (312 nm) intenzívně růžově fluoreskuje.
Ethidium bromid je mutagen, proto veškerou manipulaci s ním provádíme v rukavicích.
Pro snížení rizika kontaminace laboratoře je možné ethidium bromid do gelu nepřidávat a gel po elektroforéze barvit v roztoku ethidium bromidu a odbarvovat ho v 1x TAE pufru. Veškerou manipulaci s ethidium bromidem doporučujeme přesunout do zvláštní místnosti s dokumentačním zařízením.
Agarózové gely, vyšetřovací rukavice a plasty kontaminované ethidium bromidem skladujeme odděleně v silných PE pytlích. Likvidaci provádějí speciální firmy zabezpečující likvidaci nebezpečného odpadu. Roztoky a pufry se dekontaminují přímo v laboratoři pomocí specifických adsorpčních kolon, jejichž likvidaci opět zajišťují speciální firmy na likvidaci nebezpečného odpadu.

ELISA
Promývací pufr PBST (phosphate buffered saline+Tween): Tohoto pufru si připravíme vždy alespoň 10 litrů.
8,0 g NaCl
2,9 g Na_2HPO_4
0,2 g KH_2PO_4
0,2 g KCl
0,2 g NaN_3
0,5 ml Tween 20.
Doplníme do 1 litru destilovanou vodou, zkontrolujeme pH = 7,4.

Extrakční pufr pro révu
8,0 g NaCl
2,4 g Tris
20 g PVP K25
0,2 g KCl
0,2 g NaN_3
0,5 ml Tween 20
Doplníme do 1 litru destilovanou vodou, zkontrolujeme pH = 7,4.

Konjugátový pufr pro révu
8,0 g NaCl
2,4 g Tris
20 g PVP K25
0,2 g $MgCl_2$ x 6 H_2O
0,2 g KCl
2,0 g BSA (bovine serum albumin)
0,2 g NaN_3
0,5 ml Tween 20
Doplníme do 1 litru destilovanou vodou, zkontrolujeme pH = 7,4.

Karbonát - bikarbonátový potahový pufr pro navázání IgG
1,59 g Na_2CO_3 nebo 4,29 g Na_2CO_3 x 10 H_2O
2,93 g $NaHCO_3$
0,2 g NaN_3
Doplníme do 1 litru destilovanou vodou, zkontrolujeme pH = 9,6.

Substrátový pufr
97 ml diethanolaminu
0,2 g NaN_3
800 ml destilované vody
pH nastavíme pomocí 36% HCl na 9,8 a doplníme destilovanou vodou do 1 litru

2. Odběr a příprava vzorků

Jako odebírané pletivo pro všechny druhy testů lze pro tyto viry doporučit jednoznačně dormantní jednoleté réví. Z testované rostliny je nutno odebrat tři výhony z různých částí rostliny, z nichž pak uděláme průměrný směsný vzorek.
Výhodou tohoto materiálu je snadná manipulace s takovýmto vzorkem a možnost jeho dlouhodobého skladování (až 2 roky) v chladu, pokud zabráníme vyschnutí odebraného réví například navlhčeným filtračním papírem.

Testované réví ze tří částí keře nastříháme zahradnickými nůžkami tak, abychom dostali z každé části jedno internodium (úsek réví mezi listy). Z těchto tří částí sloupneme ostrým nožem kůru - je to tenká hnědá slupka, která se většinou snadno loupe. Pod ní se nachází jasně zelená vrstva, což je lýko, které je pro nás testovaným pletivem. Pokud je tato vrstva hnědá, je réví odumřelé a je nutno vzít jeho jinou část, která má tuto vrstvu opravdu zelenou.
Zelenou část = lýko pak škrábeme dlouhými tahy skalpelu na alobal položený na misce s ledem. Škrábeme ze všech tří připravených internodií, výsledný materiál promícháme ještě na alobalu skalpelem. Naškrábaný a promíchaný materiál přeneseme k váze. Na vážence odvážíme 0,1 g pro test PCR, nasypeme do vychlazené třecí misky a pokračujeme postupem izolace RNA, viz níže.
Potom ihned navážíme také 0,3 g pro test ELISA, nasypeme do homogenizačního sáčku a ihned zalijeme 3 ml extrakčního pufru pro ELISA a pokračujeme postupem ELISA, viz níže.
Pokud nemůžeme provádět testy ihned, lze též naškrábané lýko zamrazit - to je nutno udělat ihned po naškrábání a navážení. Mrazíme při -20° C, lépe při -80° C. Trvanlivost takto zamraženého materiálu je několik měsíců bez ztrát citlivosti testu, ale nesmí rozmrznout. Při zpracování je potom nutno zabránit rozmrznutí vzorku, dokud se nedostane do extrakčního pufru, který obsahuje antioxidanty, bránící destrukci rostlinných buněk a tím i přítomných virových částic.

Pozitivní kontrola
Jako pozitivní kontrolu používáme rostliny révy vinné infikované testovanými viry. Postup přípravy vzorků je stejný jako je uvedeno výše u testovaných rostlin. Pro ELISA můžeme použít pozitivní kontrolu dodávanou výrobcem kitu.

Negativní kontrola
Jako negativní kontrolu používáme rostliny révy vinné prosté testovaných virů. Postup přípravy vzorků je stejný jako u testovaných rostlin. Pro ELISA můžeme použít negativní kontrolu dodávanou výrobcem kitu.

3. Test RT-PCR

3.1. Izolace RNA

Z každého testovaného vzorku je nutno nejprve izolovat celkovou RNA, která obsahuje i virovou RNA, kterou pak následně detekujeme specifickým testem PCR.
Veškeré práce s nukleovými kyselinami provádíme zásadně ve sterilních rukavicích. Veškeré materiály a chemikálie používáme výhradně sterilované (autoklávované).

Pro izolaci RNA použijeme kit RNeasy Plant Mini Kit. Kit obsahuje podrobný ilustrovaný návod v angličtině, uvádíme zde pracovní překlad od češtiny.
K pufru RPE se musí přidat ethanol: 44 ml ethanolu odměříme například odměrným válcem, nalijeme do RPE pufru a označíme na víčku.

Pro homogenizaci vzorku používáme pufr RLT, před použitím se přidává 2-mercaptoethanol v množství 10 µl /1ml pufru, počítá se 1/2ml pufru na vzorek. Tedy pokud například plánujeme zpracování 10 vzorků, odlijeme si do kyvety 6 ml pufru RLT (s rezervou) a přidáme k němu 60 µl 2-mercaptoethanolu. S 2-mercaptoethanolem pracujeme v digestoři, jde jednak o toxickou, jednak o pronikavě zapáchající látku.

Dáme do mrazicího boxu -20° C vymrazit potřebný počet 2ml mikrozkumavek ve stojánku.

Navážený vzorek (0,1 g viz výše) rozetřeme v třecí misce s tekutým dusíkem na jemný prášek. Homogenizace bez použití tekutého dusíku je sice možná, ale je nutno dbát na opravdu důkladné rozetření testovaných pletiv. Lýková pletiva jsou tvořena dlouhými vlákny, proto dbáme, aby všechna tyto vlákna byla opravdu rozetřena na prášek. Důkladná homogenizace vzorku je nezbytným předpokladem správné izolace RNA!
Získaný prášek přesypeme ještě před rozmrznutím do 2ml mikrozkumavek vymražených v mrazicím boxu. Ihned přidáme předem nastavenou pipetou 500 µl pufru RLT (pufr musí již obsahovat 2-mercaptoethanol). Mikrozkumavky si bereme z mrazicího boxu jednotlivě na každý vzorek.

Každou mikrozkumavku označíme číslem vzorku a dáme třepat na vortex. Vzorky je nutno vortexovat opravdu důkladně, na nejvyšší otáčky po dobu minimálně 20 minut (lze je třepat i delší dobu, například 2 hodiny - zde můžeme s výhodou využít přestávku na oběd).

Popíšeme si fialové kolonky z kitu. Zvortexované vzorky přelijeme na kolonky, případně si pomůžeme pipetou.

Fialové kolonky se vzorky odstředíme na centrifuze při pokojové teplotě při 14 000 otáčkách 2 minuty.
Kolonky opatrně vyndáme z centrifugy a přeneseme do digestoře, stále obsahují 2-mercapto ethanol. Proteklou tekutinu přelijeme do nových popsaných 2ml mikrozkumavek (kolonky se potom vyhazují).

V dalším kroku je důležité zachovat poměr ethanolu a vzorku, takže si u vzorku pipetou orientačně odměříme objem.
Přidáme 100% ethanol v objemu 1/2 objemu vzorku (pokud jsme získali například 300 µl vzorku, přidáme 150 µl ethanolu.
Po přidání ethanolu směs ihned promícháme pipetou a přemístíme na předem popsanou růžovou kolonku.
Odstředíme při 10 000 otáčkách 1 minutu.

Proteklou tekutinu vylijeme do odpadu a zbytek vyklepneme na filtrační papír.
Do vyprázdněných růžových kolonek napipetujeme 700µl pufru RW1 a odstředíme při 10 000 otáčkách 1 minutu.

Tekutinu proteklou kolonkou znovu vylijeme a vyklepneme na filtrační papír, růžový vršek kolonky vracíme zpět na vyprázdněný spodek.
Do kolonek napipetujeme 500µl pufru RPE a opět odstředíme při 10 000otáčkách 1 minutu.
Proteklý pufr opět vylijeme.
Znovu do kolonek napipetujeme 500µl RPE a odstředíme při 10 000otáčkách 2 minuty.

Pak vezmeme mikrozkumavky bez víček (nemusí se popisovat), přemístíme na ně kolonky a znovu stočíme 14 000 otáček 2 minuty pro úplné odstranění ethanolu (přítomného v pufru RPE) z kolonek.

Z kitu vezmeme 1,5ml mikrozkumavky s víčkem, popíšeme si je číslem vzorku a datem. Na mikrozkumavku posadíme růžovou kolonku. Přidáme do ní 50 µl vody (prosté RNáz) z kitu (kolonku ihned zavíráme, abychom věděli, kde už voda je).

Odstředíme při 10 000otáčkách 2 minuty, víčka mikrozkumavek jsou otevřená (nejdou zavřít, jsou na nich kolonky) proti směru otáčení, tj. vlevo.
Takto získáme v mikrozkumavce izolovanou celkovou RNA ze vzorku. Kolonky vyhodíme.
Mikrozkumavku s izolovanou RNA skladujeme při při -80° C. Takto vydrží i několik let ve stejné kvalitě.

3.2. RT-PCR

3.2.1. Test na přítomnost GVA

Použité primery (Goszczynski and Jooste, 2003):
GVA6591F 5´ GAGGTAGATATAGTAGGACCT 3´ je amplifikační primer.
GVA6862R 5´ TCGAACATAACCTGTGGCTC 3´ je reverzní primer.
Amplifikovaný fragment má délku 272 bp, je na pozicích 6591–6862 v kompletní sekvenci GVA X75433 (Minafra et al., 1994). Tento úsek se nachází v rámci genu pro obalový protein GVA.

Smícháme v mikrozkumavce objemu 500 µl následující složky reakční směsi:

RNA	4	µl
GVA6591F, koncentrace 100 µM/µl	0,6	µl
GVA6862R, koncentrace 100 µM/µl	0,6	µl
voda	4,8	µl
celkem	10	µl

Objem primerů a vody vynásobíme počtem vzorků včetně kontrol (pozitivní a negativní), přidáme 1 vzorek jako rezervu. Uvádíme příklad pro 10 vzorků (8 vzorků a 2 kontroly):

		premix pro 10 vzorků
GVA6591F, koncentrace 100 µM/µl	0,6 µl	6 µl
GVA6862R, koncentrace 100 µM/µl	0,6 µl	6 µl
voda	4,8 µl	48 µl
celkem	10 µl	á 6 µl

Směs připravenou podle této tabulky si napipetujeme do předem popsaných mikrozkumavek po 6 µl. Přidáme 4 µl RNA.

Inkubujeme při 100° C po dobu 10 minut (v termocykleru nebo na vodní lázni) a následně ochladíme na ledu po dobu 5 minut, pak necháme 25 minut stát při pokojové teplotě.

Přidáme následující složky, používáme OneStep RT-PCR Kit:

		premix pro 10 vzorků
5x Qiagen Buffer	5 µl	50 µl
dNTP mix	1 µl	10 µl
Q roztok	5 µl	50 µl
Qiagen Enzyme Mix	1 µl	10 µl
voda	3 µl	30 µl
celkem	15 µl	á 15 µl

Celkový objem PCR reakce tak činí 25 µl, což je poloviční objem oproti doporučení výrobce!!

Ihned po přidání enzymatické směsi (Qiagen Enzyme Mix) vložíme mikrozkumavky do cykleru (PTC200) předehřátého na 45° C. Dále probíhá následující program:

45° C	45 minut	
95° C	15 minut	
94°C	45 sec.	┐
50° C	45 sec.	├ 40 x
72° C	1 min.	┘
72° C	10 minut	
10° C	stále	

Po skončení reakce přidáme k reakční směsi 2 µl FLB (Ficoll Loading Buffer) a nanášíme na 2% agarózový gel. Nanášený objem záleží na velikosti jamek v gelu. Na gel naneseme též vhodný marker. Elektroforéza probíhá při napětí 60 V u malého gelu (délky cca 15 cm). Barviva přítomná ve FLB ukazují průběh elektroforézy, necháme dojet první oranžový pruh do vzdálenosti 1 cm od konce gelu (cca 1 hodinu). Vypneme zdroj, gel vyjmeme a umístíme na 10 minut do barvícího roztoku obsahujícího Ethidium bromid. Prohlížíme pod UV světlem v dokumentačním systému. U pozitivních vzorků pozorujeme produkt délky 272 bp (délku porovnáváme s markerem). Produkt stejné délky musí být též u pozitivní kontroly. U negativní kontroly nesmí být pozorovány žádné produkty reakce PCR. U všech vzorků včetně negativní kontroly je na gelu obvykle pozorován rozmazaný pruh délky cca 90 párů bazí, což jsou primery nespotřebované během reakce PCR.

3.2.2. Test na přítomnost GVB

Použité primery (Minafra and Hadidi, 1994):
GvbA 5´ GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC 3´ je amplifikační primer.
GvbS 5´ AGTAGCCCTTCGTTTAGCCGC 3´ je reverzní primer.
Amplifikovaný fragment má délku 151 bp, je na pozicích 6983-7133 v kompletní sekvenci GVB EF583906 (Moskovitz *et al*., 2008). Tento úsek zahrnuje 3´ konec genu pro obalový protein, krátký nekódující úsek a 5´ začátek genu pro 13 kDa protein pro vazbu nukleové kyseliny.

Smícháme v mikrozkumavce objemu 500 µl následující složky reakční směsi:

RNA	4	µl
primer GvbS, koncentrace 100 µM/µl	0,6	µl
primer GvbA, koncentrace 100 µM/µl	0,6	µl
voda	4,8	µl
celkem	10	µl

Inkubujeme při 100° C po dobu 10 minut v termocykleru nebo na vodní lázni a následně ochladíme na ledu po dobu 5 minut, pak necháme 25 minut stát při pokojové teplotě.

Přidáme následující složky, používáme OneStep RT-PCR Kit (Qiagen):

5x Qiagen Buffer	5	µl
dNTP mix	1	µl
Q roztok	5	µl
Qiagen Enzyme Mix	1	µl
voda	3	µl
celkem	15	µl

Celkový objem PCR reakce tak činí 25 µl, poloviční objem oproti doporučení výrobce!!

Ihned po přidání enzymatické směsi (Qiagen Enzyme Mix) vložíme mikrozkumavky do cykleru (PTC200) předehřátého na 45° C. Dále probíhá následující program:

45° C	45 minut	
95° C	15 minut	
94°C	45 sec.	┐
50° C	45 sec.	├ 40 x
72° C	45 sec.	┘
72° C	10 minut	
10° C	stále	

Po skončení reakce přidáme k reakční směsi 2 µl FLB (Ficoll Loading Buffer) a nanášíme na 2% agarózový gel spolu s vhodným markerem (např. GeneRuler 100 bp Plus). U pozitivních vzorků obdržíme produkt délky 151 bp.

4. Test ELISA

ELISA = **E**nzyme - **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay = enzymem značený imunovazebný test
Zde jde o metodu dvojitého sendviče protilátek (double antibody sandwich - DAS ELISA).
Protokol ELISA se může lišit od zde popsaného postupu, záleží na doporučení dodavatele kitu. Princip je však stejný.
Veškeré reakce provádíme z praktických důvodů (úspora reagencií) v objemu 100 µl, i když výrobce uvádí objem reakce 200 µl.

4. 1. Potažení destiček protilátkami

Pro test se používají mikrotitrační destičky s 96 jamkami a plochým dnem. Protilátky navážeme na povrch stěn jamky. Proto ředíme IgG v karbonát - bikarbonátovém potahovém pufru, pH 9,6. Použité zředění je většinou dle údajů výrobce, nejčastěji 1:1000, tedy 10µl IgG na 10 ml pufru, což je množství potřebné na jednu destičku. Roztok IgG pipetujeme na destičku, vždy 100 µl do každé jamky. S výhodou zde použijeme osmikanálovou pipetu. Destičku poté inkubujeme 4 hodiny při 37°C.
Po skončení doby inkubace destičku promyjeme roztokem PBST. Destička se promývá třikrát, po každém promytí necháme promývací roztok v jamkách tři minuty. Používáme automatickou promývačku, kde si nastavíme vhodný program. V případě ručního promývání použijeme střičku, pomocí níž promyjeme všechny jamky na destičce promývacím pufrem tak, aby poté zůstal pufr v jamkách. Necháme tři minuty stát, pufr z destičky vyklepneme do výlevky a destičku ještě vyklepeme na filtrační papír. Tento postup třikrát opakujeme.

4. 2. Nanesení testovaných vzorků

Rostlinný materiál připravený viz výše homogenizujeme v homogenizačním sáčku s extrakčním pufrem v poměru většinou 1:10 (navážka vzorku v gramech : objem pufru v mililitrech), například 0,3 g vzorku a 3 ml pufru. Vzorek v sáčku s pufrem homogenizujeme buďto ručním nebo elektrickým homogenizátorem. Z každého takto získaného homogenátu nanášíme po 100 µl do dvou jamek na destičce.

4. 3. Pozitivní a negativní kontrola, blank

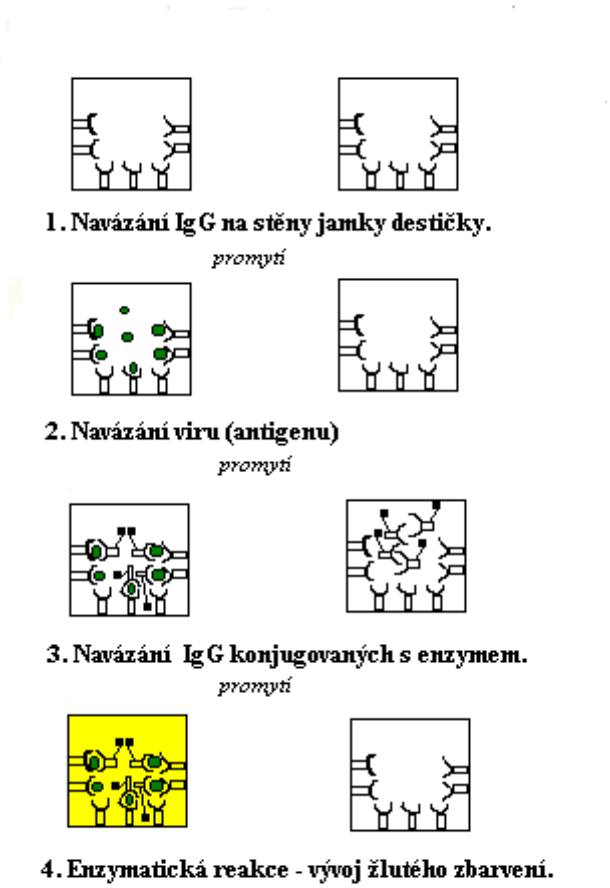
Na každé destičce je nutno umístit tzv. blank. Jde o jamky s čistým extrakčním pufrem. Tyto jamky slouží pro odečet pozadí při spektrofotometrické analýze destičky. Jako blank se nejčastěji požívají dvě jamky v levém horním rohu, poloha na destičce A1 a A2.
Negativní kontrolu používáme buďto dodanou od výrobce nebo vlastní. Umisťujeme ji nejčastěji pod blank, tedy na pozice B1 a B2.
Pozitivní kontrolu používáme opět dodanou od výrobce nebo vlastní. Umisťujeme ji nejčastěji do levého dolního rohu destičky, pozice H1 a H2.
Destičku opět zalepíme fólií a inkubujeme přes noc při 4°C. Druhý den destičku opět 3 krát promyjeme roztokem PBST.

4. 4. Protilátky značené enzymem

Na navázaný komplex protilátka - virus navážeme nyní další protilátku, tentokrát značenou enzymem. Konjugát ředíme v poměru doporučeném výrobcem, a to sice v konjugátovém pufru, uvedeném v této metodice. Roztok konjugátu pipetujeme na destičku, opět 100 µl do každé jamky destičky. Destičku zalepíme novou čistou fólií a inkubujeme 4 hodiny při 37°C.

Po konjugátu musíme destičku promýt opravdu důkladně, protože sebemenší zanechané stopy konjugátu (tedy neodmytého enzymu) způsobují vysoké pozadí barevné reakce nebo falešné pozitivní reakce.
Promýváme pětkrát roztokem PBST.

Obrázek 1: Schéma DAS-ELISA



4. 5. Enzymatická reakce

Navázaný enzym (alkalická fosfatáza) štěpí bezbarvý p- nitrofenylfosfát na fosfátovou skupinu a žlutý nitrofenol. Uvolněné množství nitrofenolu je úměrné aktivitě fosfatázy. Čím je žluté zbarvení sytější, intenzivnější (je vyšší absorbance při 405 nm), tím je vyšší koncentrace viru v testovaném vzorku.
Do každé jamky na destičce pipetujeme 100 µl roztoku substrátu v diethanolaminovém pufru (10 mg substrátu na 10 ml pufru).
Desku inkubujeme při pokojové teplotě bez přístupu světla (opět by mohlo docházet k samovolnému rozpadu p-nitrofenylfosfátu a tím k vysokému nespecifickému pozadí reakce).
V jamce, v níž byl vzorek obsahující testovaný virus, dochází k vývoji žlutého zbarvení působením zachyceného enzymu na substrát. Kde žádný virus nebyl, tam se konjugované protilátky nemohou zachytit a jsou promytím odstraněny.

Absorbanci při 405 nm (žluté zbarvení) měříme spektrofotometrem.

4. 6. Určení pozitivní reakce

Za pozitivní reakci považujeme tu hodnotu, která překročí trojnásobek směrodatné odchylky hodnot absorbance negativní kontroly. V praxi můžeme za orientační hodnotu pozitivní reakce považovat hodnotu absorbance nad 0,100, přičemž negativní kontrola by měla mít hodnoty 0,010 a méně.

Seznam obrázků v metodice

Titulní strana: Modrý Portugal, infekce A virem révy vinné
Obrázek 1: Schéma DAS-ELISA strana 14

Všechny obrázky autor ing. Petr Komínek, Ph.D.

III) Srovnání novosti postupů
Problematika detekce vitivirů révy vinné v podmínkách ČR byla v loňském roce publikována jako původní vědecká práce (Komínek et al., 2009). Praktická metodika je však v této podobě publikována vůbec poprvé.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky
Metodika je určena pro státní správu v oboru rostlinolékařství, je zaměřena na detekci významných patogenů révy vinné - jejím uživatelem je proto primárně Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, potenciálním uživatelem je též Státní rostlinolékařská správa.

V) Ekonomické aspekty
a) vyčíslení nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice
Většina laboratoří, zabývajících se zdravotním stavem množitelského materiálu, je pro metody ELISA a PCR vybavena. Náklady na vybavení zcela nové laboratoře by pak byly následující:

ELISA:
Programovatelný homogenizátor 175 000 Kč
Automatická promývačka 115 000 Kč
Reader na destičky ELISA 130 000 Kč
Velkokapacitní mrazicí box, lednice 40 000 Kč

PCR
Termocykler 200 000 Kč
Dokumentační systém 95 000 Kč

Celkem cca 755 000 Kč. Při vybavení celé laboratoře najednou lze vyjednat s dodavateli velké slevy.

b) vyčíslení ekonomického přínosu pro uživatele
Dle platné legislativy (zákon 219/2003 Sb., vyhláška 332/2006Sb) je testování množitelského materiálu révy povinné. Toto testování je jedním z úkolů ÚKZÚZ, který je primárním uživatelem této metodiky. Testování zdravotního stavu množitelského materiálu je vždy nákladem, jehož přínosy lze u vytrvalých kutur jako je réva, vyčíslovat pouze s výhledem do vzdálenější budoucnosti, tedy zlepšení výkonostních a jakostních parametrů hroznů a vína po zavedení ozdravených a testovaných množitelských materiálů do pěstitelské praxe.

VI) Seznam použité související literatury

Goszczynski DE, Jooste AEC (2003): Identification of divergent variants of Grapevine virus A. European Journal of Plant Pathology 109: 397-403.

Komínek P., Glasa M., Komínková M. Analysis of multiple virus-infected grapevine plant reveals persistence but uneven virus distribution. Acta Virologica 53, 2009: 281-285.

Minafra A, Hadidi A (1994): Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. Journal of Virological Methods 47:175-188.

Minafra A, Saldarelli P, Grieco F, Martelli GP (1994): Nucleotide sequence of the 3′ terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. Archives of Virology 137: 249-261.

Moskovitz Y, Goszczynski DE, Bir L, Fingstein A, Czosnek H, Mawassi M (2008): Sequencing and assembly of a full-length infectious clone of grapevine virus B and its infectivity on herbaceous plants. Archives of Virology 153: 323-328.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

Komínek P., Komínková-Bryxiová M., Jandurová O.M., Holleinová V. An RNA probe for the detection of *Grapevine virus A*. Journal of Phytopathology 156, 2008: 762-764.

Komínek P., Komínková M. Genetical and biological characterisation of *Grapevine virus A* isolate from the Czech Republic. Plant Protection Science 44(4), 2008: 121-126.

Komínek P., Glasa M., Komínková M. Analysis of multiple virus-infected grapevine plant reveals persistence but uneven virus distribution. Acta Virologica 53, 2009: 281-285.

Metodika diagnostiky virů rodu Vitivirus v rostlinách révy vinné v ČR

ing. Petr Komínek, Ph.D.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2011

ISBN: 978-80-7427-029-1