



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Porovnání metod izolací dvouvláknové RNA
z rostlinného pletiva se zaměřením na výtěžnost
virové frakce**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Alena Matyášová

Vedoucí práce: Mgr. Igor Koloniuk, Ph.D.

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem: **Porovnání metod izolací dvouvláknové RNA z rostlinného pletiva se zaměřením na výtěžnost virové frakce**, jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných zdravotně sociální fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 30. 7. 2019

.....

Alena Matyášová

Poděkování

Mé poděkování patří Mgr. Igoru Koloniukovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat svému muži za podporu ve chvílích, kdy jsem přestávala věřit v dokončení této práce.

Porovnání metod izolací dvouvláknové RNA z rostlinného pletiva se zaměřením na výtěžnost virové frakce

Abstrakt

Pro diagnostiku rostlinných patogenů lze využít masivně paralelní sekvenování (HTS), které má výhodu v sekvenčně nespecifickém zachycení sekvencí všech přítomných organismů ve vzorku. Vstupní materiál lze připravit více metodami podle účelu použití.

Cílem této práce je porovnat kvalitativní a kvantitativní profil dvou metod pro izolaci RNA z rostlinného pletiva s obohacením o dvouvláknové frakce za účelem zvýšení množství virových RNA vůči RNA hostitelské rostliny. Srovnávanými metodami jsou běžně využívaná afinní celulózní chromatografie a diferenciální centrifugace s LiCl.

Jako výzkumný soubor byla použita rostlina jetele lučního (*Trifolium pratense L.*) infikovaná viry s jednovláknovými a dvouvláknovými RNA genomy. Tyto viry byly v rostlině v minulosti detekovány pomocí HTS. Testovanými metodami byly z rostliny extrahovány ribonukleové kyseliny. Pomocí metody RT-PCR byly amplifikovány specifické fragmenty osmi virů a po vyhodnocení gelové elektroforézy byl porovnán kvalitativní profil obou metod. Pro porovnání kvantitativního profilu byly vybrány tři viry s různými druhy RNA genomů. Metodou RT-qPCR byla provedena jejich relativní kvantifikace. S využitím softwaru Bio-rad CFX Manager 3.1 byla vyhodnocena normalizovaná exprese jednotlivých virů k 26S ribozomální RNA jako referenční kontrole.

Pomocí obou porovnávaných metod byla detekována přítomnost všech testovaných virů. Po vyhodnocení kvantifikačních dat a provedení statistických testů (F-test, T-test) s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ bylo shledáno, že mezi metodou afinní celulózní chromatografie a metodou s diferenciální centrifugací s LiCl není signifikantní rozdíl.

Klíčová slova

rostlinný virus; dsRNA; RNA extrakce; RT-PCR; RT-qPCR

Comparison of methods of isolating double-stranded RNA from plant tissue with a focus on viral fraction yield

Abstract

High-throughput sequencing is one of methods used for diagnostics of plant pathogens and has advantage of unspecific unbiased detection of all nucleic acids present in a sample. Input material for HTS can be prepared using by different approaches that reflect purpose of the planned task. During viral infections of plants, viral double stranded RNAs are generated as replication intermediates or transcription products. Thus, they are often used for HTS. Nevertheless, such preparations contain large amount of plant RNAs. The work aimed for comparison of two methods of double stranded RNA enrichment – widely used cellulose chromatography and differential centrifugation with lithium chloride. Both qualitative and quantitative profiles of viral nucleic acids were estimated.

An isolate HZ2 of red clover (*Trifolium pratense L.*) was used for the study. Previously, there were detected eight different RNA viruses with HTS-aimed analyses in the plant. To compare qualitative profile, RNA was extracted by each method, transcribed into cDNA, and specific viral fragments were amplified using PCR, followed by agarose gel electrophoresis. Quantitative profiles were analyzed using three selected viruses with single- and double-stranded RNA genomes. Their relative quantification was estimated using RT-qPCR approach. Further, normalized (to 26S rRNA as a reference) expressions were calculated using Bio-rad CFX Manager 3.1 software.

All eight viruses were successfully detected using RNA material obtained by each method. After evaluating the quantification data and performing statistical tests (F-test, T-test; with a significance level of $\alpha = 0.05$), no significant difference was found between the compared methods.

Key words

plant virus; dsRNA; RNA extraction; RT-PCR; RT-qPCR

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1 Rostlinné viry	9
2.1.1 Obecná charakteristika	9
2.1.2 Genomy virů rostlin	10
2.1.3 Reprodukce virů	11
2.1.4 Rostlinné patogeny a diagnostika	14
2.2 Diagnostické metody	15
2.2.1 Biologické metody	15
2.2.2 Sérologické metody	16
2.2.3 Fyzikální metody	17
2.2.4 Molekulární metody	19
3. Cíle práce a hypotézy	24
3.1 Cíl práce	24
3.2 Hypotéza	24
4. Metodika	25
4.1 Úvod do problematiky	25
4.2 Výzkumný soubor	26
4.3 Metody	28
4.3.1 Izolace dsRNA metodou celulózní afinní chromatografie	28
4.3.2 Izolace dsRNA metodou diferenciální centrifugace s LiCl	30
4.3.3 Ošetření RNA kitem TURBO DNA-free TM	31
4.3.4 Syntéza cDNA	32
4.3.5 Testování kvalitativního profilu RT-PCR metodou	33
4.3.6 Testování kvantitativního profilu metodou RT-qPCR	34
5. Výsledky	39
5.1 Izolace nukleových kyselin	39
5.2 Testování kvalitativního profilu metodou RT-PCR	39
5.3 Testování kvantitativního profilu metodou RT-qPCR	40
6. Diskuse	44
7. Závěr	46
Seznam zdrojů	47
Seznam obrázků	54

Seznam tabulek	55
Seznam použitých zkratek	56

1. Úvod

Viry jsou nebuněčné organismy, jejichž existence je pevně provázána s buněčným světem, neboť replikace jsou schopné pouze v buňkách. Viry jako takové tvoří velmi početnou a rozmanitou skupinu vyskytující se ve všech druzích organismů.

Na rostlinné viry je pohlíženo jako na buněčné parazity. Především v zemědělství jsou významnými patogeny. Virové choroby mohou působit rozsáhlé škody v úrodě hospodářsky významných plodin a s tím spojené ekonomické ztráty. Řada vlastností virů zůstává velkou neznámou, ale lze předpokládat, že některé jejich vlastnosti by mohly být z pohledu člověka v budoucnu užitečné.

Ochrana rostlin před virovými onemocněními je založena především na včasné diagnostice. V dávné minulosti si člověk musel vystačit pouze se symptomatologií. Dnes se diagnostika opírá o sérologické metody, a především o metody molekulární. Hitem posledního desetiletí se ve výzkumných laboratořích staly metody umožňující masivně paralelní sekvenování (high-throughput sequencing, HTS). Tyto metody produkují velká množství sekvenčních dat a lze je využít pro různé účely.

Diagnostické využití HTS v rostlinné patologii má výhodu v sekvenčně nespécifickém zachycení sekvencí všech přítomných organismů ve vzorku. Největší přínos HTS je v diagnostice rostlinných chorob s neznámou etiologií. Koncentrace rostlinných virů bývají velmi nízké a sekvence hostitelského organismu pak tvoří balast. Hostitelský genom je tvořen dsDNA. Většina rostlinných virů má genom tvořený RNA. Některé viry jsou přirozeně tvořeny dsRNA, jiné tuto formu tvoří během svého replikačního cyklu. Toho lze využít při přípravě vzorku pro HTS metodou tzv. obohacení o dsRNA, kterou lze navýšit množství virových RNA vůči RNA hostitelské rostliny. V současnosti se k obohacení nejčastěji využívá metody afinní celulózní chromatografie. V odborné literatuře jsou popsány i další postupy, kterými lze obohacení dosáhnout.

V této práci bude porovnán kvantitativní a kvalitativní profil dvou metod pro obohacení dsRNA. Jednou z metod bude již výše zmiňovaná metoda afinní celulózní chromatografie a druhou metodou bude diferenciální centrifugace s LiCl. Jako výzkumný soubor bude použit izolát jetele infikovaný RNA viry s jednovláknovými a dvouvláknovými genomy. Zjištěné poznatky mohou přispět k větší efektivitě zpracování vzorku a izolaci materiálu s větším podílem virové RNA.

2. Literární přehled

2.1 Rostlinné viry

Nejstarší dochovaný psaný záznam o výskytu onemocnění způsobeném rostlinnými viry pochází z roku 752, kdy japonský básník Empress Koken zakomponoval do své básně verš o rostlině se žloutnoucími listy, později identifikované jako *Eupatorium lindleyanum*, pravděpodobně napadené virem tobacco leaf curl virus. Ačkoliv nejstarší dochované záznamy o onemocněních způsobených lidskými viry pochází z období před více než 2000 lety, první skutečný objev virové částice popsal v roce 1892 Iwanowski na rostlinném viru, a to na viru mozaiky tabáku (Hull, 2009).

2.1.1 Obecná charakteristika

Viry lze charakterizovat jako nebuněčné organismy, jejichž existence je pevně spjatá s existencí buněk (Nečas, 2000). Replikace jsou schopné pouze v hostitelské buňce, protože nemají vlastní metabolický aparát. Viry jsou zastoupeny velice rozmanitým souborem mikroorganismů, z čehož vyplývá i velká šíře hostitelů. Virový genom nese genetickou informaci o tom, jaké vlastnosti virus má. Tato informace se předává z generace na generaci. Vzhledem k tomu, že viry dokážou tuto informaci proměňovat, jsou vysoce adaptabilní (Navrátil, 2011).

Aby bylo možné se v této vysoce heterogenní skupině virů orientovat, bylo nutné ji systematicky rozřídít podle daných kritérií. V současnosti je problematika taxonomie řízena Mezinárodní komisí pro taxonomii virů (ICTV). Ta stanovila, že budou využívány tyto taxonomické jednotky: řád, čeleď, podčeleď, rod a druh (King et al., 2011).

Dle velikosti jsou virové partikule velmi různorodé. ICTV uvádí, že *Porcine circovirus 1* má velikost 17 – 20,7 nm. Ale například viry patřící do rodu *Closterovirus* dosahují délky až 2000 nm (King et al., 2011). Virová částice obsahuje jeden typ nukleové kyseliny tvořící virový genom, a to buď ribonukleovou kyselinu (RNA), nebo deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). Tato kyselina je obalena proteinovým pláštěm (kapsidou), který je zpravidla tvořen jedním nebo několika málo druhy proteinů. Tyto molekuly se k sobě navzájem spojují autoagregací podle fyzikálních a chemických afinit a vytvářejí spolu s nukleovou kyselinou tzv. nukleokapsidu (Celer et Celer, 2010). Virové částice mohou být tvořeny pouze nukleokapsidou (neobalené viry), nebo mohou mít ještě speciální

vrstvu tvořenou lipoproteiny (obalené viry). Obalový protein tvoří běžně jen 5 až 10 % kapacity genomu viru. Existují i viry, které gen pro obalový protein nemají vůbec (*Umbravirus*) a využívají bílkovin hostitele, nebo se nacházejí v komplexu s jinými viry (Petrzik, 1999). Zvláštní případ jsou endornaviry, které nemají žádný obal (King et al., 2011).

Z hlediska diagnostiky virů je obalový protein důležitý, protože nese antigenní epitopy, proti kterým lze připravit protilátky. Lze tedy využít sérologické metody, např. ELISA, difuze v agaru atd., k jejich detekci (Petrzik, 1999).

Částice je možné rozlišit podle symetrie virové kapsidy. Kapsida s helikální symetrií je tvořena polypeptidy řadícími se jednotlivě za sebou a stáčeující se jako spirála kolem vlákna genomové kyseliny. Kapsida s ikozahedrání symetrií má většinou tvar dvacetistěnu s třemi osami souměrnosti. Je tvořena dvěma druhy kapsomer (morfologických jednotek tvořících kapsidu) – pentony a hexony (Celer et Celer, 2010). Nejmenší viry mají kapsidu vytvořenou z 60 podjednotek, větší kapsidy s ikozahedrání symetrií jsou tvořeny násobkem počtu 60 podjednotek. Kapsidy, jejichž tvar nelze charakterizovat podle symetrie, se nazývají komplexní (Navrátil, 2011).

2.1.2 Genomy virů rostlin

Virový genom je tvořen jedním druhem nukleové kyseliny. Podle charakteru nukleové kyseliny lze viry rozdělit do dvou základních skupin, a to do skupiny zahrnující DNA viry a skupiny zahrnující RNA viry (Celer et Celer, 2010). Při srovnání zastoupení rostlinných virů v jednotlivých skupinách jednoznačně převládají viry s genomem tvořeným RNA (Petrzik, 1999).

DNA viry mohou mít genom tvořený jednovláknovou DNA (ssDNA) nebo dvouvláknovou DNA (dsDNA). RNA viry mohou mít genom tvořený jednovláknovou RNA (ssRNA) nebo dvouvláknovou RNA (dsRNA). Viry se ssRNA mohou mít různou polaritu vlákna. Pokud má virus genom tvořený RNA s pozitivní polaritou (+)ssRNA, pak se vlákno chová jako messenger RNA (mRNA) a lze ho přímo překládat na ribozomech do struktury polypeptidu. Toto vlákno je samo o sobě infekční a při experimentálním vpravení do buňky lze zahájit jeho replikaci se vznikem nových virových částic. Genom tvořený RNA s negativní polaritou (-)ssRNA musí být nejprve přepsán do podoby mRNA pomocí virové RNA transkriptázy. DNA viry i RNA viry

mohou mít nukleovou kyselinu uspořádanou do kruhové nebo lineární konformace. (Celer et Celer, 2010).

Genom nemusí být vždy souvislý. Může být rozčleněn na několik segmentů. U virů s takovýmto genomem často dochází ke genetické rekombinaci, kdy mohou vznikat nové antigenní varianty. K rekombinaci může dojít i v případě, že je hostitelská buňka napadena dvěma podobnými viry nebo různými mutanty jednoho viru (Nečas, 2000). V evoluci virů se uplatňují i mutace, ke kterým dochází v důsledku chyb při replikaci. Častěji jsou mutacemi postiženy RNA viry v důsledku větší chybovosti RNA polymerázy (Petrzik, 1999). Většina virů nemá mechanismus pro opravu mutací. Letální mutace jsou velmi rychle vyselektovány a eliminovány, čímž dochází k relativní genetické stabilitě viru (Nečas, 2000).

Aby byl virus schopný se po infekci do hostitelské buňky autonomně množit a šířit do dalších buněk, musí mít v genomu minimálně tři geny, a to gen pro replikázu, obalový protein a protein umožňující jeho šíření do dalších buněk. Existují ovšem i tzv. satelitní viry, které mají pouze gen pro obalový protein. Jsou ale závislé na pomocném viru infikujícím téhož hostitele, jehož aparát využívají pro vlastní replikaci (Petrzik, 1999). Těmto pravidlům se vymykají viry z čeledi *Endornaviridae*, jejichž genomová DNA kóduje pouze jediný otevřený čtecí rámeček (ORF) nazývaný “long protein gen” (Gibbs et al., 2000). Umbraviry také tvoří konvenční virové částice. Jejich genom neobsahuje gen pro obalový protein, a proto využívají “výhod” obalového proteinu pomocného viru, obvykle viru z čeledi *Luteoviridae* (King et al., 2011). Genomy ssRNA virů tvoří výraznou sekundární strukturu, kdy v oblastech obsahujících komplementární nukleotidy dochází k vytváření vodíkových můstků umožňujících tvorbu smyček (Celer et Celer, 2010).

2.1.3 Reprodukce virů

K reprodukci rostlinných virů dochází převážně v rostlinných buňkách, ale existují rostlinné viry schopné reprodukce i v jiných druzích buněk. Např. tospoviry, rhabdoviry, marafiviry a reoviry se mohou množit jak v rostlině, tak i ve svém vektoru, na kterého nemají negativní vliv (Rosypal, 2002).

Rostlinné viry pronikají do buněk jen pasivně, protože jim adsorpci na povrch buňky znemožňuje buněčná stěna. Tuto bariéru mohou překonat pouze v místech jejího

poškození. K tomu může dojít mechanickým způsobem nebo např. sajícím hmyzem. Jakmile virus vstoupí do buňky, dochází k jeho geneticky podmíněné interakci s cytoplazmatickými receptory. Po rozbalení a uvolnění nukleové kyseliny nastává replikace a exprese virového genomu. Jakmile se vytvoří dostatečné množství kopií genomové kyseliny a strukturních proteinů, dochází k složení virionů. Do dalších buněk viry mohou procházet přes plasmodezmata. Na delší vzdálenosti se infekce šíří cévními svazky. K šíření využívají tzv. movement proteinů, které dokážou modifikovat plasmodezmata i jiné transportní cesty tak, aby byl možný prostup virionů (Navrátil, 2011).

Způsob replikace a exprese se odvíjí podle toho, jakými vlastnostmi disponuje virový genom. David Baltimore rozdělil viry podle strategie replikace a exprese genomu do skupin uvedených dále v textu (Celer et Celer, 2010).

Viry s dvouvláknovou DNA (dsDNA)

U těchto virů nejdříve dochází k transkripci pomocí DNA dependentní RNA polymerázy a exprimují se geny kódující proteiny, které tlumí expresi buněčných proteinů. Později se transkribují geny pro strukturní proteiny virů. K replikaci DNA a transkripci mRNA většinou dochází v jádru hostitelské buňky za účasti buněčného enzymatického aparátu (Celer et Celer, 2010).

Viry s jednovláknovou DNA (ssDNA)

Replikace probíhá mechanismem ve směru ssDNA>dsDNA>ssDNA. Podle pozitivního vlákna se syntetizuje vlákno negativní za vzniku replikativní dsDNA formy. Tato forma slouží pro transkripci i replikaci (Hull, 2009).

Viry s dvouvláknovou RNA (dsRNA)

Po injikaci viru do buňky jsou aktivovány enzymy, které vytvoří podle negativního vlákna komplementární pozitivní vlákno. Pozitivní vlákno má také funkci mRNA a v ribozomu je překládáno za vzniku proteinů. Po nasyntetizování dostatečného množství proteinů dochází k částečnému zabalení vytvořených pozitivních vláken, zahájí se syntéza vláken negativních a vytvoří se dsRNA molekuly. Poté nastává uzavření virionu (Petrzik, 1999).

Viry s jednovláknovou RNA pozitivní polarity (ss(+)RNA)

Přibližně tři čtvrtiny rostlinných virů má genomovou jednovláknovou RNA kyselinu s pozitivní polaritou. Pozitivní vlákno může být rovnou překládáno na ribozomu za vzniku proteinů včetně RNA dependentní RNA polymerázy. Z původního pozitivního vlákna může být vytvořeno komplementární vlákno negativní, podle kterého se za vzniku dsRNA struktury replikuje nové pozitivní vlákno (Petrzik, 1999).

Viry s jednovláknovou RNA negativní polarity (ss(-)RNA)

Protože negativní vlákno nemůže být překládáno na ribozomu, musí být přítomna RNA dependentní RNA polymeráza jako aktivní enzym již ve virové částici. Ta vytvoří komplementární pozitivní vlákno za vzniku dsRNA struktury a mRNA, které jsou na ribozomu překládány za vzniku proteinů. Podle pozitivního vlákna se replikuje vlákno negativní (Celer et Celer, 2010).

Viry se segmentovanou jednovláknovou RNA negativní polarity (ss(-)RNA)

Genom je tvořen více segmenty a každý segment je přepisován samostatně RNA dependentní RNA polymerázou přítomnou jako aktivní enzym ve virionu. Z každého segmentu vzniká mRNA, která je překládána na ribozomu za vzniku jednoho nebo dvou proteinů (Celer et Celer, 2010).

Viry s reverzní transkripcí

Viry s dsDNA genomem replikující se mechanismem ve směru DNA>RNA>DNA se nazývají pararetroviry. Po injikaci viru do buňky dsDNA proniká do jádra, kde vytvoří tzv. minichromozom, který se stává templátem pro přepis do RNA. Replikační cyklus lze rozdělit do dvou fází. V nukleární fázi je virová DNA přepisována buněčnou DNA dependentní RNA polymerázou za vzniku RNA transkriptu (Hull, 2009). Petrzik (1999) uvádí, že (+)RNA vlákno má dvě funkce, a to funkci matrice pro replikaci a funkci mRNA pro translaci. V cytoplasmatické fázi je RNA transkript zpětně přepisován RNA dependentní DNA polymerázou neboli reverzní transkriptázou do DNA (Hull, 2009). Tato fáze zahrnuje syntézu ssDNA vlákna, eliminaci RNA matrice a konverzi na dsDNA genomovou kyselinu (Gutierrez, 2006).

Retroviry jsou viry mající genom v DNA i RNA verzi. Virová částice nese ssRNA pozitivní vlákno, které není používáno jako mRNA, ale je pomocí reverzní transkriptázy přepsáno do komplementárního vlákna DNA. RNA vlákno je poté degradováno a k DNA vláknu je vytvořeno druhé komplementární. Tato dsDNA vstupuje do jádra hostitele, kde

se začlení do buněčného genomu a stává se jeho trvalou součástí. Takto vložená DNA je dále přepisována buněčným aparátem do mRNA molekul (Clark et Pazdernik, 2013).

2.1.4 Rostlinné patogeny a diagnostika

Rostlinné viry se vyznačují obligátním parazitismem, ale chovají se jako typické patogeny, jejichž interakcemi s hostitelem vzniká choroba (Navrátil, 2011). Virové choroby mohou způsobit značné škody v úrodě hospodářsky významných plodin. Jejich míra škodlivosti je výrazně závislá na vnějších povětrnostních podmínkách, které mohou ovlivnit infekci rostlin v různém stádiu vývoje. Pokud je rostlina infikována v raném stádiu vývoje, škody mohou dosahovat obrovských rozměrů, ale pokud je infikována v nejzazším stádiu vývoje, pak škody mohou být zanedbatelné (Musil et al., 1981).

Rostlinné viry se mohou přenášet několika způsoby. K přenosu z generace na generaci může dojít při vegetativním rozmnožování rostlin, např. hlízami, kořeny, rouby (Musil et al., 1981). Některé viry mají schopnost infikovat gametofyty, a tak se mohou přenášet z generace na generaci semeny (Bennett, 1969). Také může docházet k přenosu viru na povrchu semene, odkud se během klíčení dostane do rostliny (Musil et al., 1981). Významně se na přenosu rostlinných virů podílí různé druhy přenašečů, například savý hmyz a háďátka (Kúdela et al., 1989). Mechanickým přenosem se rozumí přenos virů poraněním rostliny. Tento způsob přenosu bývá využíván experimentálně při mechanické inokulaci a je běžně využíván při diagnostice onemocnění. K přenosu může docházet i přirozeně při kontaktu zdravých a infekčních rostlin, používáním kontaminovaného nářadí, přenosem na ruku (Dijkstra et Khan, 2006).

Pokud je rostlinná buňka vnímavá na virovou agens, pak během několika hodin dojde k aktivaci reprodukčního cyklu viru. Infekce může probíhat bezpříznakově, mohou se objevit lokální příznaky infekce, jako např. chlorotické léze, nekrotické léze, mozaiky. K systémovým příznakům dochází, když se infekce šíří v rostlině (Navrátil, 2011). Tyto příznaky jsou velice různorodé. Manifestují se různými barevnými změnami, deformacemi listů, plodů, snížením kvality a výnosu sklizně, zvýšenou citlivostí k jiným chorobám (Rod, 2017).

Účinná ochrana rostlin před virovými infekcemi je komplikovaná. Zaměřuje se především na eliminaci zdrojů infekce, likvidaci přenašečů infekce a také na šlechtění rezistentních rostlin (Musil et al., 1981).

Aby byla ochrana rostlin co nejvíce účinná, je potřeba provést diagnostiku, tedy zjistit původce choroby. Pro diagnostiku byly vyvinuty různé diagnostické metody, které se liší přesností i spolehlivostí a jejich použití se odvíjí od konkrétní situace (Kazda et al., 2010).

2.2 Diagnostické metody

2.2.1 Biologické metody

Diagnostika virových chorob pomocí biologických metod je časově a finančně mnohem náročnější než většina dalších dostupných metod. Tyto metody však mají v diagnostice stále své místo (Hull, 2009). Při latentní infekci nebo při onemocnění s netypickými příznaky, které lze snadno zaměnit za poruchy podmíněné jinými činiteli, je nezbytné dokázat anebo vyloučit přítomnost viru pomocí dalších metod (Musil et al. 1981). Nevýhodou biologických metod je, že mohou být zdrojem infekce pro místní plodiny, zvláště při práci s novými nebo karanténními viry (Hull, 2009).

Symptomatologie

Metoda pomáhá určit příčinu poškození rostliny vyhodnocením viditelných příznaků (symptomů). Pro použití této metody je nezbytný soubor znalostí o původcích chorob, rostlinách, podmínkách prostředí a jejich vztazích (Kazda et al. 2010). Podle Vidhyasekarana (2004) lze podle příznaků spolehlivě detekovat pouze malé množství virových onemocnění.

Přenos na indikátorové rostliny

Každá dostatečně vnímavá rostlina, na kterou lze přenést příslušný druh viru uměle nebo pomocí přenašečů, může být použita jako pokusná nebo testovací rostlina (Musil et al., 1981). Ideální indikátorovou rostlinou je taková, která po inokulaci rychle a charakteristicky reaguje tvorbou symptomů (Smith, 1977). Rostliny, které tvoří pouze lokální léze a virus se v nich nešíří do dalších částí, se dají využít nejen pro diferenciaci jednotlivých virů nebo jejich kmenů, ale také pro určování vlastností virů nacházejících se v šťávě z infikovaných rostlin. Rostliny, které na inokulaci reagují systémově, to znamená, že se příznaky objevují na nově vznikajících listech a vzdálených místech, lze využít nejen k diferenciaci virů, ale i k množení virů za účelem purifikace, na přípravu antigenu pro sérologické testování, pro uchování atd. (Musil et al., 1981). Dijkstra et Khan (2006) popisují přenos na indikátorové rostliny mechanickou inokulací pomocí inokula vytvořeného z části listu s jasnými příznaky, roubováním a také pomocí

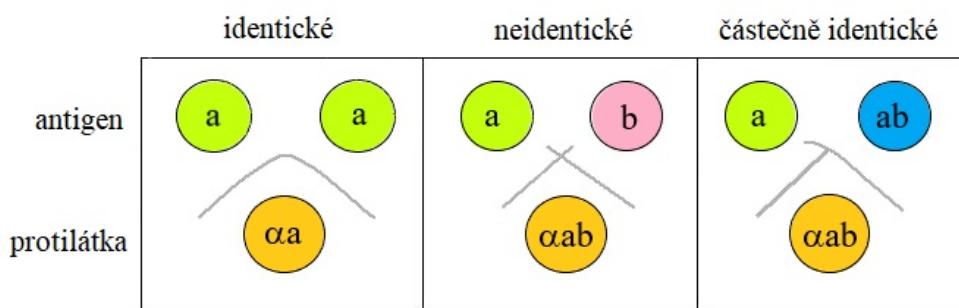
parazitické rostliny rodu *Cuscuta*. Pokud je potřeba zjistit, zda je virus přenositelný hmyzem, odeberou se tyto jedinci z nemocné rostliny a přenesou se na připravené zdravé testovací rostliny zakryté silonovými klíčkami, aby se zabránilo úniku hmyzích přenašečů. Po určité době se hmyz usmrtí insekticidem a rostliny se pěstují další 3 až 4 týdny ve skleníku. Poté následuje vyhodnocení vzniklých příznaků (Musil et al., 1981).

2.2.2 Sérologické metody

Sérologické metody jsou založené na reakci antigenu s protilátkou přítomnou v antiséru za vzniku komplexu antigen-protilátka. Antisérum proti rostlinným virům se připravuje imunizací zvířete (například králíka). Virová suspenze je injikována do zvířete, které reaguje tvorbou specifických protilátek. Čisté antisérum je získáno vysrážením a následnou centrifugací odebrané krve (Musil et al., 1981). Protože imunitní odpověď má polyklonální charakter, antisérum získané imunizací reaguje s více epitopy na antigenu (Hořejší et Bartůňková, 2002). Monoklonální protilátky se získávají technologií z tzv. hybridomu, který vznikl fúzí mezi myší myelomovou buňkou a myším B lymfocylem pocházejícím z myši imunizované antigenem (Kohler et Milstein, 1975).

Dvojitá difúze v agarovém gelu (Ouchterlonyho test)

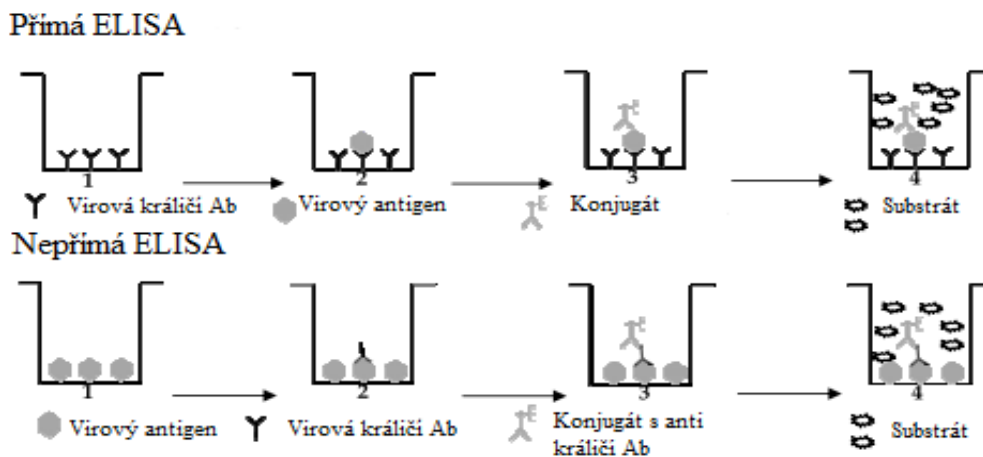
Metoda je založena na sérologickém principu, kdy ve vrstvě agarového gelu proti sobě difundují antigen a protilátky. Při pozitivní reakci se v místě střetu vytvoří precipitační linie (Musil et al., 1981). Lima et al. (2012) zmiňuje využití testu k diagnostice polyhedrálních a malých tyčinkových virů. Přestože má tato metoda omezenou citlivost, je stále využívána k vyhodnocení titru antiséra a k definování sérologického vztahu mezi viry a jejich kmeny, jak zobrazuje obrázek 1.



Obrázek 1: Sérologický vztah virů a jejich kmenů
(zdroj: vlastní)

ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay)

Metodu ELISA pro studium a identifikaci rostlinných virů zavedli v roce 1976 Clark a Adams. Na rozdíl od jiných imunologických technik, které využívají tvorby nerozpustných imunokomplexů, tato metoda je schopna citlivě detekovat nesrážlivé reakce umožněné použitím enzymem značených protilátek (Clark et Adams, 1976). Metoda se běžně provádí v 96jamkových polystyrenových destičkách přidáním antigenu a protilátky v určeném pořadí s oplachem mezi každým krokem. V konečném stádiu, je-li reakce pozitivní, dojde k vytvoření žlutého produktu v důsledku reakce substrátu a enzymem značené protilátky. Metoda nabízí více variant. Přímá a nepřímá varianta je schematicky zobrazena na obrázku 2 (Lima et al., 2012).



Obrázek 2: Přímá a nepřímá ELISA
(zdroj: Lima et al., 2012)

2.2.3 Fyzikální metody

Mikroskopie

Mikroskopy využívají pro zobrazování objektů různé druhy světelných paprsků i svazky elektronů (Alberts et al., 2006). Použití jednotlivých druhů mikroskopů je dáno jejich rozlišovací schopností (Nebesářová, 2001). Některé viry tvoří charakteristické proteinové inkluze v cytoplasmě infikovaných rostlin. Tyto inkluze je možné v infikovaných tkáních vidět pomocí světelného mikroskopu (Morales, 2006). Pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) lze pozorovat buňky, buněčné orgány i biologické makromolekuly (Nebesářová, 2001). Touto metodou lze objasnit základní morfologii virionů a zařadit je do čeledi nebo rodů (Morales, 2006). Vzorky pro TEM lze připravit několika metodami, např. metodou ultratenkých řezů nebo metodou negativního

kontrastu. Při pozorování vzorku fluorescenčním mikroskopem se využívá specifické vazby fluorescenčních barviv na určité molekuly v buňkách. Tyto molekuly lze potom vidět jako jasně zářící objekty na tmavém pozadí (Alberts et al., 2006).

Centrifugace

Tato separační metoda je využívána k izolaci a purifikaci buněčných makromolekul a organel. Využívá pohybu částic v tekutém prostředí, kde vznikají vlivem otáčení rotoru centrifugy odstředivé síly. Sedimentační rychlost jednotlivých částic je závislá na jejich tvaru, velikosti, hustotě a na vlastnostech prostředí, v kterém sedimentace probíhá. Rychlost pohybu částice udává sedimentační koeficient, který se využívá k popisu a charakterizaci jednotlivých částic. Hodnoty sedimentačních koeficientů se udávají v tzv. Svedbergových jednotkách (Šmarda et al., 2008).

Spektrofotometrie

Obalové proteiny rostlinných virů absorbují ultrafialové záření o vlnové délce 250 až 280 nm. Čisté virové preparáty obsahují hlavně nukleoproteiny a při měření UV spektrofotometrem vykazují charakteristickou křivku mezi 260 a 280 nm. Při absenci nukleových kyselin je křivka velmi strmá s ostrým vrcholem na 280 nm. Izometrické viry mají strmější křivku než vláknité viry v důsledku jiného poměru nukleových kyselin k proteinům (Morales, 2006).

Spektrofotometrické metody lze využít k odhadu koncentrace nukleových kyselin za předpokladu, že budou zbaveny látek absorbujících UV záření. Pokud jsou vzorky dostatečně čisté, lze spektrofotometrem měřit absorbované UV záření. Další možností je použití Ethidium bromidu jako interkalačního barviva (vmezeří se mezi báze), které po ozáření UV světlem emituje fluorescenční záření. Tato metoda je vhodná pro měření vzorku o nízké koncentraci kyseliny nebo když nemá dostatečnou čistotu. Absorbance 1 při optické denzitě 260 nm odpovídá 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA a 40 $\mu\text{g/ml}$ ssRNA. Vlastní měření probíhá při optické denzitě 260 a 280 nm. Z poměru naměřených hodnot při optické denzitě 260 a 280 nm lze zjistit čistotu vzorku. Čistá DNA má poměr cca 1,8 a RNA cca 2,0 (Barbas et al., 2010).

2.2.4 Molekulární metody

Extrakce a purifikace nukleových kyselin

Většinu molekulárních metod předchází extrakce nukleových kyselin a jejich purifikace od ostatních buněčných komponent za účelem získání dostatečného množství nativní kyseliny v potřebné čistotě (Šmarda et al., 2008). Extrakci z rostlinných tkání mohou komplikovat různé chemické sloučeniny jako např. polysacharidy a polyfenoly přítomné v těchto tkáních (Deshmukh et al., 2007).

Lyzí buněčné stěny dochází k uvolnění obsahu buněk. Rostlinná pletiva je zapotřebí před vlastní lyzí zhomogenizovat v tekutém dusíku. Výtěžnost a kvalita extrahované RNA může být ovlivněna přítomností ribonukleáz, proto se doporučuje během lyzačního kroku přidat redukční činidlo β -merkaptoetanol nebo méně toxický dithiotreitol (Mommaerts et al., 2015).

Fenol-chloroformová extrakce

Metoda odděluje směsi molekul na základě rozdílných rozpustností jednotlivých molekul ve dvou nemísitelných kapalinách (Sambrook et Russell, 2010). Směs fenol-chloroform se nemísí s vodou. Po důkladném protřepání s lyzátem dojde k degradaci a vysrážení proteinů, které po centrifugaci vytvoří interfázi mezi vodnou fází obsahující nukleové kyseliny a organickou fází (Šmarda et al., 2008). Při extrakci RNA se využívá kyselého roztoku obsahující guanidinium thiokyanát, octan sodný, fenol a chloroform, díky kterému DNA přechází spolu s proteiny do interfáze nebo organické fáze. Celková RNA je potom izolována precipitací izopropanolem (Chomczynski et Sacchi, 2006), který zajistí odstranění zbytkového fenolu a chloroformu a převedení izolované kyseliny do menšího objemu. Přidáním iontů Na^+ nebo NH_4^+ a snížením teploty na -70°C lze podpořit srážení (Šmarda et al., 2008).

Purifikace nukleových kyselin chromatografií

Chromatografické kolony bývají umístěny v centrifugačních zkumavkách. K purifikaci je možné využít dva způsoby, a to gelovou chromatografií a afinní chromatografií. Při gelové chromatografii velké molekuly nukleových kyselin procházejí kolonou rychleji než malé molekuly, které jsou zadržovány póry v matici. Při afinní chromatografii dochází k interakci mezi makromolekulami vzorku a kolonou. Nejdříve dochází k imobilizaci nukleových kyselin na koloně a promýváním se odstraní nežádoucí

molekuly. Po použití jiného pufru dojde k eluci nukleových kyselin z kolony (Šmarda et al., 2008).

Hybridizace

Metoda je založena na faktu, že jednovláknové nukleové kyseliny opačné polarity s dostatečnou komplementaritou bazí mohou vytvářet dvouvláknové molekuly. Párování bazí jako základ molekulární hybridizace má dvě etapy, denaturaci nukleových kyselin a následné obnovení párů bazí (Hull, 2009). Hybridizační sonda je jednovláknová chemicky nebo radioaktivně značená molekula DNA nebo RNA, která se během hybridizace naváže na cílovou sekvenci, kterou je poté díky sondě možné detekovat (Šmarda et al., 2008). V mnoha hybridizačních systémech je cílová sekvence imobilizována na pevném povrchu, který je potom v kontaktu s roztokem obsahujícím sondu. Před vlastní detekcí je nutné nenavázanou sondu odmyt (Hull, 2009).

- **Dot Blot hybridizace** je široce používaná technika pro detekci nukleových kyselin u většího počtu vzorků. Extrakt nukleové kyseliny je denaturován a potom ve formě kapek nanesen na membránu.
- **In Situ hybridizace** může objasnit rozšíření viru v rámci buňky, tkáně, případně identifikovat oblasti chromozomu, kde je virus integrován.
- **DNA Microarray** je hybridizace fluorescenčně značených cílových sekvencí a sond, které jsou jako malé tečky navázány na sklíčku (tvoří čip). Sondy na čipu mohou být z různých virů. Lze tedy detekovat více virů najednou (Hull, 2009).

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metodu umožňující specificky detekovat a produkovat velké množství fragmentů DNA vynalezl Kary B. Mullis v roce 1983 (Mullis, 1990). Klíčovým prvkem v PCR reakci je termostabilní enzym DNA polymeráza umožňující amplifikaci specifických úseků DNA za použití sekvencně specifických oligonukleotidů, tzv. primerů (Valasek et Repa, 2005). Primery jsou krátké úseky DNA o délce cca 18-30 bazí (Rosypal, 2002), které jsou komplementární k cílové DNA. Dalšími komponenty PCR reakce jsou nukleotidy, pomocí kterých pak DNA polymeráza syntetizuje nový PCR produkt (Garibyan et Avashia, 2013).

Reakce obvykle probíhá v cca 20 až 30 cyklech, které zahrnují tyto kroky:

- denaturace dsDNA při teplotě 94 – 98 °C za vzniku dvou oddělených DNA řetězců,
- nasednutí primerů na jednotlivé řetězce při teplotě 30 – 75 °C,
- polymerizační reakce při teplotě 65 – 75 °C (Rosypal, 2002).

Výsledný produkt je vizualizován nejčastěji pomocí interkalačního barviva (např. Ethidium bromid, SYBR Gold) nebo pomocí fluorescenčně značených nukleotidů či primerů elektroforeticky na agarózovém gelu, který umožňuje stanovit přítomnost a velikost PCR produktu (Garibyan et Avashia, 2013).

PCR reakce má mnoho modifikací, např. pro amplifikaci molekul RNA se používá tzv. reverzní PCR (RT-PCR), kdy RNA je nejdříve přepsána pomocí reverzní transkriptázy do tzv. komplementární DNA (cDNA), která slouží jako templát pro standardní PCR reakci (Rosypal, 2002).

Real-Time PCR (qPCR)

PCR sledovaná v reálném čase (Real-Time PCR) slouží pro kvantifikaci PCR produktu během reakce (Rosypal, 2002). Metoda umožňuje současně amplifikovat a kvantifikovat specifické sekvence nukleových kyselin během probíhající PCR reakce. To je dosaženo použitím specifických technologií založených na fluorescenci. Používají se fluorescenční sondy vázající se na specifickou sekvenci nebo interkalační barviva typu SYBR Green nebo EvaGreen, která fluoreskují po navázání na dsDNA. Interkalační barviva nejsou sekvencně specifická, proto mají univerzální použití. Nevýhodou je, že se mohou vázat i na vznikající primer-dimery a tím způsobovat chybnou detekci. Kvantifikace může být vyjádřena absolutně, tedy v přesném počtu kopií specifické nukleové kyseliny na vzorek, nebo relativně, tedy kolikrát více specifické nukleové kyseliny je v jednom vzorku v porovnání s druhým (VanGuilder, et al., 2008). Pro relativní kvantifikaci se používají dva přístupy. Jeden přístup předpokládá, že efektivity amplikonů (cíl, reference) jsou podobné a blíží se 100 %. Druhý přístup počítá s tím, že efektivity dvou amplikonů se liší (Livak et Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

Sekvenování

Účelem sekvenování nukleových kyselin je určení pořadí jednotlivých nukleotidů v molekulách nukleových kyselin neboli stanovení primární struktury. Rozvoj metod

umožňujících určit primární strukturu nukleových kyselin nastal v 2. polovině 20. století. První metody byly schopné stanovit primární strukturu molekuly DNA nepřímo přes sekvenci RNA (Alberts et al., 2002). V roce 1977 byly popsány dvě různé metody sekvenování DNA (Maxam et Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977).

Maxamovo-Gilbertovo sekvenování

Metoda je založena specifickém štěpení molekuly DNA pomocí chemických činidel v místech specifických pro danou bázi. V současnosti se již nevyužívá.

Sangerovo sekvenování

Metoda je založena na prodlužování DNA pomocí DNA polymerázy ve směsi s deoxyribonukleotidy (dNTP). Do rostoucího řetězce je začleněn příslušný značený dideoxyribonukleotid (ddNTP) bez OH skupiny na 3'konci mající funkci koncového inhibitoru. Tato metoda byla později zautomatizována, což umožnilo paralelně sekvenovat více vzorků. Radioaktivní značení ddNTP bylo nahrazeno fluorescenčním. Výsledkem analýzy je sekvence jednoho úseku DNA o velikosti do 1500 bází. Metoda je využívána dodnes.

Sekvenování nové generace - vysokokapacitní sekvenování (HTS)

S rychlým rozvojem genetického výzkumu a vznikajícími projekty na získání sekvence lidského genomu přestalo být Sangerovo sekvenování dostačující. Po roce 2000 začaly spatřovat světlo světa první metody umožňující masivně paralelní sekvenování označované jako sekvenování nové generace, kdy během jednoho experimentu je najednou sekvenováno velké množství molekul (Krejčí et al., 2015). V současnosti lze pro sekvenování využít několik platforem. Trhu dominují tyto tři:

- Roche 454 Genome Sequencer,
- Illumina Genome Analyzer,
- Life Technologies SOLiD Systém.

Každá z jednotlivých technologií využívá rozdílného přístupu a chemie, ale sdílí tyto kroky:

- příprava templátu, vytvoření knihovny fragmentů DNA,
- sekvenování a detekce inkorporovaných nukleotidů,
- analýza dat.

Výhodou vysokokapacitního sekvenování je produkce velkého objemu sekvenčních dat za velmi krátkou dobu a relativně nízkou cenu (na jeden nukleotid), což z něj činí velice užitečný nástroj pro řadu aplikací. Využívá se např. pro *de novo* genomové sekvenování, cílené (targeted) sekvenování, analýzu transkriptomu. HTS technologie dále nacházejí uplatnění v molekulární diagnostice nejrůznějších onemocnění (Koubková et al., 2014). Je využitelné pro určení bakteriálního společenství na základě cíleného sekvenování prokaryotického 16S rRNA genu (Sanschagrín et Yergeau, 2014).

Navzdory tomu, že pro viry a viroidy neexistují univerzální detekční primery, HTS technologie značně usnadňují jejich diagnostiku. Přitom lze použít celou řadu postupů pro přípravu vstupního materiálu:

- deplece rRNA,
- polyA selekce,
- extrakce totální nukleové kyseliny (VANA),
- obohacení dsRNA,
- sekvenování malých RNA (small interfering RNAs) (Massart et al., 2014).

3. Cíle práce a hypotézy

3.1 Cíl práce

Cílem práce je porovnat kvantitativní a kvalitativní profil dvou metod pro obohacení dsRNA. Porovnávanými metodami budou:

- afinní celulózní chromatografie,
- diferenciální centrifugace s LiCl.

Získaná data budou analyzována. Výsledky RT-qPCR budou statisticky vyhodnoceny.

3.2 Hypotéza

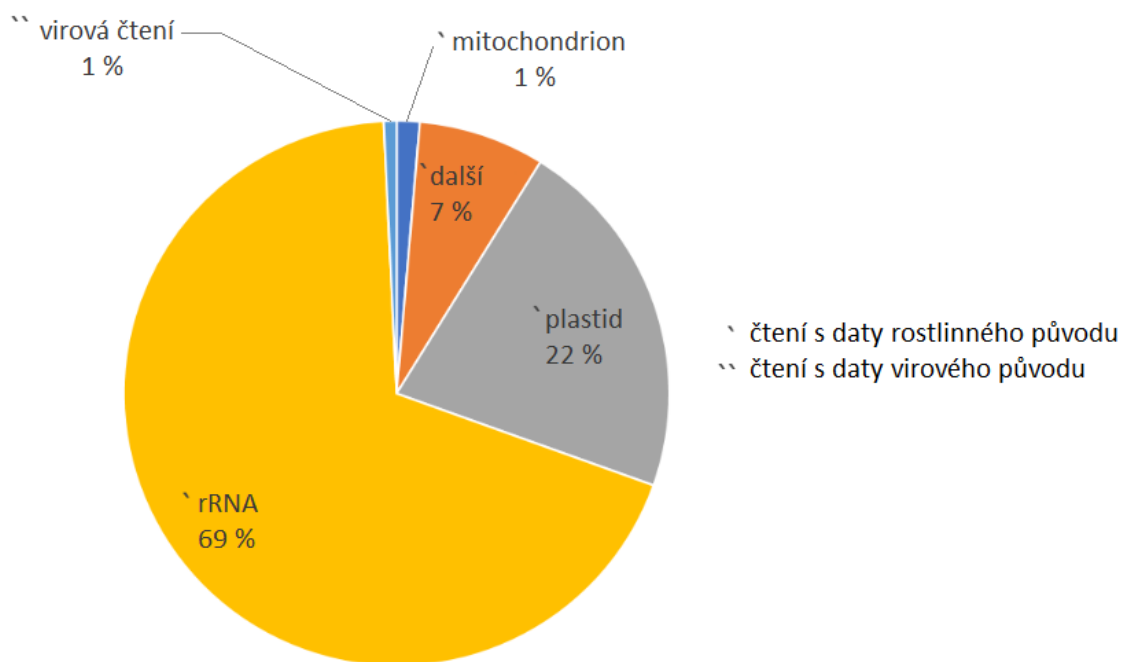
Metodou pro obohacení dsRNA založené na diferenciální centrifugaci s LiCl lze nahradit stávající postup, tedy metodu afinní celulózní chromatografie.

4. Metodika

4.1 Úvod do problematiky

V rostlinné virologii je v posledních letech hojně využíváno metody umožňující masivně paralelní sekvenování (HTS). Touto metodou je možné získat velké množství sekvenčních dat (čtení) využitelných k diagnostickým účelům. Problémem ovšem je, že většina těchto dat pochází z hostitelské rostliny a jsou balastem. Pokud je z rostlinného pletiva extrahována RNA za účelem získání virové nukleové kyseliny, pak tento extrakt bude vždy obsahovat ve většinovém množství nukleové kyseliny rostlinného původu a jen v minimálním množství virové nukleové kyseliny.

Na obrázku 3 je graf zobrazující sumarizovanou distribuci čtení získaných pomocí HTS z rostliny jetele lučního (označení vzorku HZ2). Z grafu je patrné, že pouze 1 % čtení má virový původ a celých 99 % čtení patří rostlině. Proto je důležité věnovat metodám pro přípravu vstupního materiálu dostatečnou pozornost, zvláště je-li cíleno na virová data.



Obrázek 3: Graf sumarizované distribuce čtení získaných sekvenováním rostliny HZ2 (zdroj: Koloniuk, 2017)

4.2 Výzkumný soubor

Jako výzkumný soubor byla použita rostlina jetele lučního (*Trifolium pratense* L.) infikovaná RNA viry s různými genomy. Rostlina byla poskytnuta pro výzkumné účely firmou Šlechtění jetele a trav Dr. Hana Jakešová. Symptomatologicky lze rostlinu popsat jako zakrslou, se žlutými a nekrotickými skvrnami na listech a s deformací listů. Na obrázku 4 je porovnán habitus zkoumané rostliny se zdravou kontrolou.



Obrázek 4: Rostlina HZ2 versus zdravá kontrola
(zdroj: Koloniuk et al., 2018)

Tato rostlina (označení vzorku – HZ2) byla v minulosti podrobena analýze HTS za účelem etiologické studie onemocnění jetele lučního (Koloniuk et al., 2018). V rostlině bylo nalezeno osm RNA virů s různými typy genomů. Souhrn nalezených virů je uveden v tabulce 1.

Pro účely kvantitativního porovnání jednotlivých metod obohacení dsRNA byly vybrány tři viry zastupující jednotlivé typy RNA genomů:

- ss(+)RNA virus - red clover enamovirus 1 příbuzný virům z čeledi *Luteoviridae*,
- dsRNA virus – red clover cryptic virus 1 z čeledi *Partitiviridae*,
- ss(-)RNA virus – red clover associated varicosavirus příbuzný virům čeledi *Rhabdoviridae*.

Tabulka 1: Přehled virů nalezených v rostlině HZ2

BLASTX search (accessed on December 18, 2017)											
Name	Closest viral hit	Accession number	E-value	description	coverage, %	identity, %	Segments	Total length, kb	Total number of the specific reads	Fraction of total, %	Suggested taxonomy
Red clover enamovirus 1*	Alfalfa enamovirus 2	ARQ18732.1	0.0	RNA-dependent RNA polymerase P1-P2 fusion protein	61	82	1	5.8	230,344	0.3546	Luteoviridae
Chickpea chlorotic stunt virus	Chickpea chlorotic stunt virus	YP_667838.2	0.0	RNA-dependent RNA polymerase	55	87	1	6.1	9,969	0.0153	Luteoviridae
Soybean dwarf virus	Soybean dwarf virus	AIII15913.1	0.0	RNA-dependent RNA polymerase P1-P2 fusion protein	54	99	1	4.7	3,983	0.0061	Luteoviridae
Red clover enamovirus 2*	Pea enation mosaic virus-2	AEM45994.1	0.0	RNA-dependent RNA polymerase	60	82	1	4.2	25,035	0.0385	Umbravirus
Red clover cryptic virus 1	Red clover cryptic virus 1	YP_008719882.1	0.0	RNA-dependent RNA polymerase	94	99	2	3.7	1,515	0.0023	Partitiviridae
Red clover torradovirus 1*	Lettuce necrotic leaf curl virus	YP_009389536.1	0.0	polyprotein, contains RNA-dependent RNA polymerase	93	55	2	11.9	127,650	0.1965	Secoviridae
Red clover associated varicosavirus*	Alopecurus myosuroides varicosavirus 1	YP_009130617.1	1e-22	polyprotein	74	58	2	10.3	3,419	0.0053	Rhabdoviridae
Red clover RNA virus 1*	Beet necrotic yellow vein virus	NP_705701.1	9e-105	RNA-dependent RNA polymerase	21	41	1	7	2,219	0.0034	Not determined

* Tentative names of novel viruses.

(zdroj: Koloniuk et al., 2018)

4.3 Metody

Pro následující procesy byl z několika listů rostliny jetele lučního HZ2 připraven směsný vzorek. Listy byly vysušeny lyofilizací. Experimentálně bylo zjištěno, že 1 g čerstvého materiálu po lyofilizaci vážil cca 0,02 g. Vysušené listy byly rozdrceny v třecí misce s tloučkem po přidání kapalného dusíku. Směsný vzorek byl potom rozvážen po 0,02 g do plastových 2 ml zkumavek a uchován při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v hlubokomrazícím boxu do dalšího použití. Testovanými metodami byl zpracován vždy ve třech opakováních (3 extrakty RNA / metoda).

Následující pasáž o rozsahu 2 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále bakalářské práce uloženém na Zdravotně sociální fakultě JU.

4.3.2 *Izolace dsRNA metodou diferenciální centrifugace s LiCl*

Metodika pro izolaci dsRNA metodou diferenciální centrifugace s LiCl vychází z publikace Diaz-Ruiz et Kaper (1978) a byla upravena pro potřeby této práce.

Metoda je založena na faktu, že přidání soli (LiCl) k extraktu totální RNA způsobí, že dojde k rozdílné precipitaci jejích složek v závislosti na koncentraci této soli v extraktu. Toho lze využít pro selektivní separaci jednotlivých kyselin postupným zvyšováním koncentrace LiCl. Podle autorů zmiňované publikace dochází k precipitaci dsRNA, jestliže finální koncentrace LiCl v roztoku je 4 M.

Potřebné chemikálie:

- chloroform:isoamylalkohol 24:1 (Fluka),
- fenol saturovaný 0,1 M citrátovým pufrům, pH 4,3 (Sigma-Aldrich),
- 10x STE pufr: 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris, 0,001 M Na₂EDTA, pH 7,0,
- 10 % SDS (hmotnost/objem),
- 4 M LiCl sterilizovaný přes filtr s velikostí pórů 0,2 μm,
- 8 M LiCl sterilizovaný přes filtr s velikostí pórů 0,2 μm,
- TURBO DNA-free™ kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific),
- ethanol 70 % p.a.

Přístrojová technika:

- rotátor,
- NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific),
- stolní chlazená centrifuga – Universal 32R (Hettich Zentrifugen),
- 1,5 ml, 2 ml, 5 ml sterilní zkumavky bez nukleáz.

Pracovní postup:

- K 0,02 g lyofilizovaného a rozdrceného vzorku v 2 ml zkumavce přidat 800 μl 2x STE pufru, řádně protřepat. Pak přidat 400 μl chloroform:isoamylalkoholu, 600 μl fenolu, 100 μl 10 % SDS a protřepat.
- Nechat 30 minut točit na rotátoru. Centrifugovat 15 minut / 13 000 g / 4 °C. Odebrat vodnou fázi do čisté 2 ml zkumavky.
- Přidat stejný objem 4 M LiCl. Promíchat převrácením zkumavky.
- Nechat stát přes noc v chladičí místnosti při 4 °C v nádobě s ledem.

- Centrifugovat 15 minut / 18 000 g / 4 °C.
- Odebrat supernatant do čisté 5 ml zkumavky.
- Přidat stejný objem 8 M LiCl.
- Nechat stát přes noc v chladicí místnosti při 4 °C v nádobě s ledem.
- Centrifugovat 15 minut / 18 000 g / 4 °C.
- Odstranit supernatant.
- Pelet omýt 1 ml 70 % ethanolu.
- Po odstranění ethanolu pelet vysušit v otevřené zkumavce při pokojové teplotě 10 minut.
- Pelet rozpustit v 50 µl DEPC vody.
- Získaný extrakt RNA kyseliny ošetřit kitem TURBO DNA-free™ pro odstranění kontaminující DNA podle návodu výrobce.
- Ověřit koncentraci získaného produktu na přístroji NanoDrop.
- RNA uchovat při -70 °C v hlubokomrazicím boxu.

4.3.3 Ošetření RNA kitem TURBO DNA-free™

Žádnou RNA izolací nelze vyextrahovat pouze RNA, vždy se v extraktu nachází určité množství DNA. Tímto postupem lze odstranit kontaminující DNA z purifikované RNA.

Potřebné chemikálie:

- 10x TURBO DNase pufr,
- TURBO DNase,
- DNase inaktivátor.

Přístrojová technika:

- minicentrifuga (Hettich Zentrifugen),
- sterilní 1,5 ml zkumavky bez nukleáz.

Pracovní postup:

- Přidat 0,1 objemu 10x TURBO DNase pufru a 1 µl TURBO DNase k RNA a jemně promíchat pipetou.
- Inkubovat 30 minut / 37 °C.
- Přidat 0,1 objemu resuspendovaného inaktivátoru a dobře promíchat pipetou.
- Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Během inkubace občasně promíchat.

- Centrifugovat 1,5 minuty / 10 000 g / pokojová teplota.
- Odebrat čirý supernatant do čisté 1,5 ml zkumavky.

4.3.4 Syntéza cDNA

Pro PCR metody je výchozím materiálem DNA. Proto byla ze získaných extraktů RNA vytvořena jejich komplementární forma, tedy byla nasyntetizována tzv. cDNA.

Potřebné chemikálie:

- Maxima H Minus reverzní transkriptáza 200 U/ μ l (Thermo Scientific),
- RiboLock RNase inhibitor 20 U/ μ l (Thermo Scientific),
- 5x RT pufr (Thermo Scientific),
- primer Random Hexamer 0,2 μ g/ μ l (Thermo Scientific),
- dNTP Mix 10 mM každého (Thermo Scientific).

Přístrojová technika:

- termocykler MJ Mini (BIO RAD),
- 0,2 ml sterilní zkumavky bez nukleáz.

Pracovní postup:

Z jednotlivých RNA extraktů byly vytvořeny jejich cDNA (CEL – získané z metody s celulózou, LIT – získané z metody s LiCl). Paralelně byly od každého extraktu RNA vytvořeny tzv. NoRT kontroly k zjištění případné kontaminace genomovou DNA, které obsahovaly stejné komponenty jako cDNA kromě reverzní transkriptázy. Bylo připraveno 20 μ l každé reakce podle tabulky 2.

Tabulka 2: Reakční mix pro přípravu cDNA

RNA CEL / LIT	50 ng / 200 ng
primer Random Hexamer	1 μ l
dNTP Mix	1 μ l
DEPC voda	do 14,5 μ l
Reakční teplota 65 °C / 5 min	
5x RT pufr	4 μ l
RiboLock RNase inhibitor	0,5 μ l
Maxima H Minus reverzní transkriptáza	1 μ l
Reakční teplota 25 °C / 10 min + 50 °C / 30 min + 85 °C / 5 min	

(zdroj: vlastní)

4.3.5 Testování kvalitativního profilu RT-PCR metodou

Ve vzorku jetele HZ-2 bylo v minulosti nalezeno pomocí metody HTS osm RNA virů. Po reverzní transkripci extraktů RNA je možné PCR metodou detekovat specifické fragmenty virů.

Potřebné chemikálie:

- SapphireAmp[®] PCR Master Mix (TaKaRa),
- detekční primery o koncentraci 10 μ M,
- GelRed[™] (Biotium),
- FastRuler Middle Range DNA Ladder (Thermo Scientific),
- TopVision Agarose (Thermo Scientific),
- 10x TBE pufr: 1,0 M TRIS-borát, 20mM EDTA, pH 8,3.

Přístrojová technika:

- termocykler MJ Mini (BIO RAD),
- 0,2 ml sterilní zkumavky bez nukleáz,
- elektroforéza EasyCast B1 (Thermo Scientific),
- transiluminátor c150 (Azure biosystems).

Pracovní postup:

Pro test kvalitativního profilu byla vybrána jedna cDNA CEL a jedna cDNA LIT. Bylo připraveno 15 μ l každé reakce podle tabulky 3.

Tabulka 3: Reakční mix pro přípravu PCR reakce

	Celulóza	LiCl
cDNA	2 μ l (naředěné 1:2)	2 μ l (naředěné 1:8)
SapphireAmp [®] PCR Master Mix	7,5 μ l	7,5 μ l
primer 1	0,75 μ l	0,75 μ l
primer 2	0,75 μ l	0,75 μ l
DEPC voda	4 μ l	4 μ l

(zdroj: vlastní)

Každý virus byl detekován jednou dvojicí primerů uvedených v tabulce 4.

Tabulka 4: Detekční primery pro jednotlivé viry

virus	označení primeru	sekvence primeru, 5' - 3'	Velikost ampliconu	teplotní program
Red clover enamovirus 1	1932	CTATCAATCTGAGGCTGCATC	382 bp	96 °C/ 30 s + (96 °C/5 s + 56 °C /30 s +72 °C/ 10 s) x 35 + 72°C/2 min
	1933	TTCATAGCCCCAGAACCTAG		
Chickpea chlorotic stunt virus	2229	TGAGTTTGGCACTTGATGGTG	349 bp	
	2230	CGTTCGGGCCGAGTCTATC		
Soybean dwarf virus	SDV _f	ACGAATATGGTCGCGGTTAG	541 bp	
	SDV _r	TCCCCTTGTAGTGGACCTTG		
Red clover enamovirus 2	1475	CTCCTCGTGTGCCAGGAAC	458 bp	
	1479	GCAGGGACTTCGGAGACAAT		
Red clover cryptic virus 1	1928	TTCCTCAGTGATGCAAACCTTATT	406 bp	
	1929	CTTAAGGCTGATGGGACTAGA		
Red clover torradovirus 1	1158	GTAACACACCTCCATGCGCT	360 bp	
	1159	GCGAGAACCCTCAAGCTTCT		
Red clover RNA virus 1	1210	GCTTTGTAGGAGGCCATTGG	621 bp	
	1213	GAAGGTCCAGCCATCCTTGT		
Red clover associated varicosavirus	1186	ATCCTCTGGTGACCATGTTC	697 bp	
	1187	ACAGATTGGCAAAACAGTGT		

(zdroj: vlastní)

PCR produkty byly zkontrolovány nanesením 3 µl každého produktu na 2 % agarózový gel barvený fluorescenční barvou GelRedTM (1 µl barvy / 10 ml 0,5x TBE). Jako reference byl použit marker FastRuler Middle Range DNA Ladder. Po elektroforéze (96 V /30 min) byl gel zobrazen pomocí transiluminátoru s UV při 302 nm.

4.3.6 Testování kvantitativního profilu metodou RT-qPCR

Potřebné chemikálie:

- detekční primery o koncentraci 10 µM,
- 5x HOT FIREpol[®] EvaGreen[®] qPCR (Solis BioDyne).

Přístrojová technika:

- thermocykler C1000TM s Real-Time PCR detekčním systémem CFX96 (BioRad),
- Software BioRad CFX Manager 3.1,
- 96jamková destička pro PCR,
- elektronická pipeta (Sartorius).

Pracovní postup:

Pro účely kvantitativního porovnání jednotlivých metod obohacení dsRNA byly vybrány tři viry zastupující jednotlivé typy RNA genomů:

- ss(+)RNA virus - red clover enomovirus 1 z čeledi *Luteoviridae*,
- dsRNA virus – red clover cryptic virus 1 z čeledi *Partitiviridae*,
- ss(-)RNA virus – red clover associated varicosavirus z čeledi *Rhabdoviridae*.

Po HTS analýze vzorku HZ2 bylo zjištěno, že největší zastoupení v počtu čtení měla ribozomální RNA¹, proto byla použita 26S ribozomální RNA jako referenční kontrola.

Pro každý analyt byla navržena jedna dvojice primerů, stejně tak byly navrženy primery amplifikující fragment 26S rRNA z jetele. Z dvojice primerů byl vytvořen primer mix, ve kterém každý z primerů byl v koncentraci 10 μM. Primery byly navrženy tak, aby velikost ampikonu byla cca 150 bp. Seznam primerů s jejich sekvencemi je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5: Primery pro kvantifikaci pomocí RT-qPCR

virus	označení primeru	sekvence primeru, 5' – 3'	velikost ampikonu
red clover enomovirus 1	1458	AATGGGAGAGCGACCTTTGG	162 bp
	1444	TCAGAGCGAGGCATTCATGA	
red clover cryptic virus 1	1630	AACAACGTAGCCACCCGAAA	149 bp
	1631	TCGGCTTGTTCTTCGACCTC	
red clover associated varicosavirus	1394	AGCCCAGGAGTGTTACATTA	122 bp
	1600	AACCTCAATCAAGATGCCATC	
26S ribozomální RNA	1259	CCAAGTCAGACGAACGATTT	138 bp
	1896	TTTTGTGAAGGGTTCGAGTG	

(zdroj: vlastní)

¹ Obrázek 3 na str. 25 - Graf sumarizované distribuce čtení získaných sekvenováním rostliny HZ2

Pro přesnější kvantifikaci je potřeba znát efektivitu PCR (Taylor et al., 2010). Jako templát byla použita jedna cDNA CEL ze skupiny syntetizovaných komplementárních DNA. Z této cDNA byly vytvořeny dvě ředící řady. Ředění bylo navrženo tak, aby se hodnoty Ct (cyklus prahu) pohybovaly v obecně doporučeném rozmezí 10 až 35.

Příprava první ředící řady:

První vzorek byl naředěn v poměru 1:5. Každý další vzorek byl získán ředěním 1:5 z předchozího. Postupně bylo naředěno sedm vzorků. Tato řada sloužila pro zjištění efektivity PCR při použití primerů pro amplifikaci virových fragmentů.

Příprava druhé ředící řady:

První vzorek byl naředěn 1:1000. Z něj byl získán další vzorek ředěním v poměru 1:5 a dále bylo postupováno stejně jako při ředění první řady. Postupně bylo naředěno sedm vzorků. Tato ředící řada sloužila pro zjištění efektivity PCR při použití primerů amplifikujících 26S ribozomální RNA.

Naředěné vzorky byly nanесeny na 96jamkovou PCR destičku vždy ve třech opakováních. Dále byla na destičku nanесena ve třech opakováních beztemplátová (NTC) kontrola a dále NoRT² kontrola pro ribozomální primery. Na obrázku 5 je zobrazeno schéma PCR destičky se vzorky. Ty byly nanесeny od nejkonzentrovanejších (horní řádek) až po vzorky s největším ředěním včetně NTC (spodní řádek). Reakce probíhala v objemu 10 µl při tomto teplotním programu:

95 °C/10 min + (95 °C/ 10 s + 60 °C/ 20 s + 72 °C/20 s) x 40.

Dále byla připojena křivka tání, jejíž analýza probíhala při teplotě 65 °C až 95 °C krokově po 0,5 °C / 5 s.

² Připravena stejným postupem jako cDNA, ale bez reverzní transkriptázy.

ředění		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1:5	A	1394:1600	1394:1600	1394:1600	1630:1631	1630:1631	1630:1631	1458:1444	1458:1444	1458:1444
1:25	B	1394:1600	1394:1600	1394:1600	1630:1631	1630:1631	1630:1631	1458:1444	1458:1444	1458:1444
1:125	C	1394:1600	1394:1600	1394:1600	1630:1631	1630:1631	1630:1631	1458:1444	1458:1444	1458:1444
1:625	D	1394:1600	1394:1600	1394:1600	1630:1631	1630:1631	1630:1631	1458:1444	1458:1444	1458:1444
1:3125	E	1394:1600	1394:1600	1394:1600	1630:1631	1630:1631	1630:1631	1458:1444	1458:1444	1458:1444
1:15625	F	1394:1600	1394:1600	1394:1600	1630:1631	1630:1631	1630:1631	1458:1444	1458:1444	1458:1444
1:78125	G	1394:1600	1394:1600	1394:1600	1630:1631	1630:1631	1630:1631	1458:1444	1458:1444	1458:1444
	H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
		1394:1600	1394:1600	1394:1600	1630:1631	1630:1631	1630:1631	1458:1444	1458:1444	1458:1444

		1	2	3	4	5	6
1:1000	A	1259:1896	1259:1896	1259:1896	NoRT 1259:1896	NoRT 1259:1896	NoRT 1259:1896
1:5000	B	1259:1896	1259:1896	1259:1896			
1:25000	C	1259:1896	1259:1896	1259:1896			
1:125000	D	1259:1896	1259:1896	1259:1896			
1:625000	E	1259:1896	1259:1896	1259:1896			
1:3125000	F	1259:1896	1259:1896	1259:1896			
1:15625000	G	1259:1896	1259:1896	1259:1896			
	H	NTC 1259:1896	NTC 1259:1896	NTC 1259:1896			

1394:1600	Red clover associated varicosavirus
1630:1631	Red clover cryptic virus 1
1458:1444	Red clover enamovirus 1
1259:1896	26S ribozomální RNA

Obrázek 5: Rozložení vzorků na PCR destičce při měření efektivity PCR (zdroj: vlastní)

Reakční mix je uveden v tabulce 6. Data byla zpracována softwarem BioRad Manager CFX 3.1.

Tabulka 6: Reakční mix pro RT-qPCR

naředěná cDNA	5 µl
5x HOT FIREpol® EvaGreen®qPCR	2 µl
primer mix 10 µM	0,25 µl
DEPC voda	2,75 µl
	∑ 10µL

(zdroj: vlastní)

Po zjištění efektivity PCR byla provedena kvantifikace jednotlivých analytů. Komplementární cDNA CEL byly naředěny v poměru 1:200 a cDNA LIT byly naředěny v poměru 1:10, aby hodnoty Ct pro všechny stanovované analyty vycházely v rozmezí 10 až 35. Z každé cDNA byly připraveny reakční mixy pro amplifikaci všech stanovovaných analytů podle tabulky 6. Dále byly připraveny NTC kontroly pro všechny dvojice primerů a NoRT kontroly pro ribozomální primery.

Reakční mixy pro amplifikaci jednotlivých analytů byly nanášeny na PCR destičku vždy ve třech opakováních, jednotlivé NTC kontroly a NoRT kontroly ve dvou opakováních. Možné uspořádání vzorků na PCR destičce je zobrazeno na obrázku 6. Řádek A až D je určen pro reakční mixy obsahující cDNA CEL a řádek E až H je určen pro reakční mixy obsahující cDNA LIT. Reakce probíhala v objemu 10 µl při stejném teplotním programu včetně křivky tání jako u testu efektivity. Data byla zpracována softwarem BioRad Manager CFX 3.1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	cDNA1 1259:1896	cDNA1 1259:1896	cDNA1 1259:1896	cDNA2 1259:1896	cDNA2 1259:1896	cDNA2 1259:1896	cDNA3 1259:1896	cDNA3 1259:1896	cDNA3 1259:1896	NTC 1259:1896	NTC 1259:1896	NoRT 1259:1896
B	cDNA1 1394:1600	cDNA1 1394:1600	cDNA1 1394:1600	cDNA2 1394:1600	cDNA2 1394:1600	cDNA2 1394:1600	cDNA3 1394:1600	cDNA3 1394:1600	cDNA3 1394:1600	NTC 1394:1600	NTC 1394:1600	NoRT 1259:1896
C	cDNA1 1630:1631	cDNA1 1630:1631	cDNA1 1630:1631	cDNA2 1630:1631	cDNA2 1630:1631	cDNA2 1630:1631	cDNA3 1630:1631	cDNA3 1630:1631	cDNA3 1630:1631	NTC 1630:1631	NTC 1630:1631	
D	cDNA1 1458:1444	cDNA1 1458:1444	cDNA1 1458:1444	cDNA2 1458:1444	cDNA2 1458:1444	cDNA2 1458:1444	cDNA3 1458:1444	cDNA3 1458:1444	cDNA3 1458:1444	NTC 1458:1444	NTC 1458:1444	
E	cDNA1 1259:1896	cDNA1 1259:1896	cDNA1 1259:1896	cDNA2 1259:1896	cDNA2 1259:1896	cDNA2 1259:1896	cDNA3 1259:1896	cDNA3 1259:1896	cDNA3 1259:1896	NTC 1259:1896	NTC 1259:1896	NoRT 1259:1896
F	cDNA1 1394:1600	cDNA1 1394:1600	cDNA1 1394:1600	cDNA2 1394:1600	cDNA2 1394:1600	cDNA2 1394:1600	cDNA3 1394:1600	cDNA3 1394:1600	cDNA3 1394:1600	NTC 1394:1600	NTC 1394:1600	NoRT 1259:1896
G	cDNA1 1630:1631	cDNA1 1630:1631	cDNA1 1630:1631	cDNA2 1630:1631	cDNA2 1630:1631	cDNA2 1630:1631	cDNA3 1630:1631	cDNA3 1630:1631	cDNA3 1630:1631	NTC 1630:1631	NTC 1630:1631	
H	cDNA1 1458:1444	cDNA1 1458:1444	cDNA1 1458:1444	cDNA2 1458:1444	cDNA2 1458:1444	cDNA2 1458:1444	cDNA3 1458:1444	cDNA3 1458:1444	cDNA3 1458:1444	NTC 1458:1444	NTC 1458:1444	

1394:1600	Red clover associated varicosavirus
1630:1631	Red clover cryptic virus 1
1458:1444	Red clover enamovirus 1
1259:1896	26S ribozomální RNA

Obrázek 6: Uspořádání vzorků na PCR destičce při kvantitativním měření (zdroj: vlastní)

5. Výsledky

5.1 Izolace nukleových kyselin

Pomocí dvou odlišných metod bylo získáno celkem 6 extraktů RNA obohacených o dvouvláknové RNA (3 opakování / metoda). Po ošetření RNA kitem TURBO DNA-freeTM byla ověřena koncentrace spektrofotometricky pomocí NanoDropu. Výsledky měření jsou v tabulce 7. Všechny extrakty RNA byly převedeny do jejich komplementární cDNA.

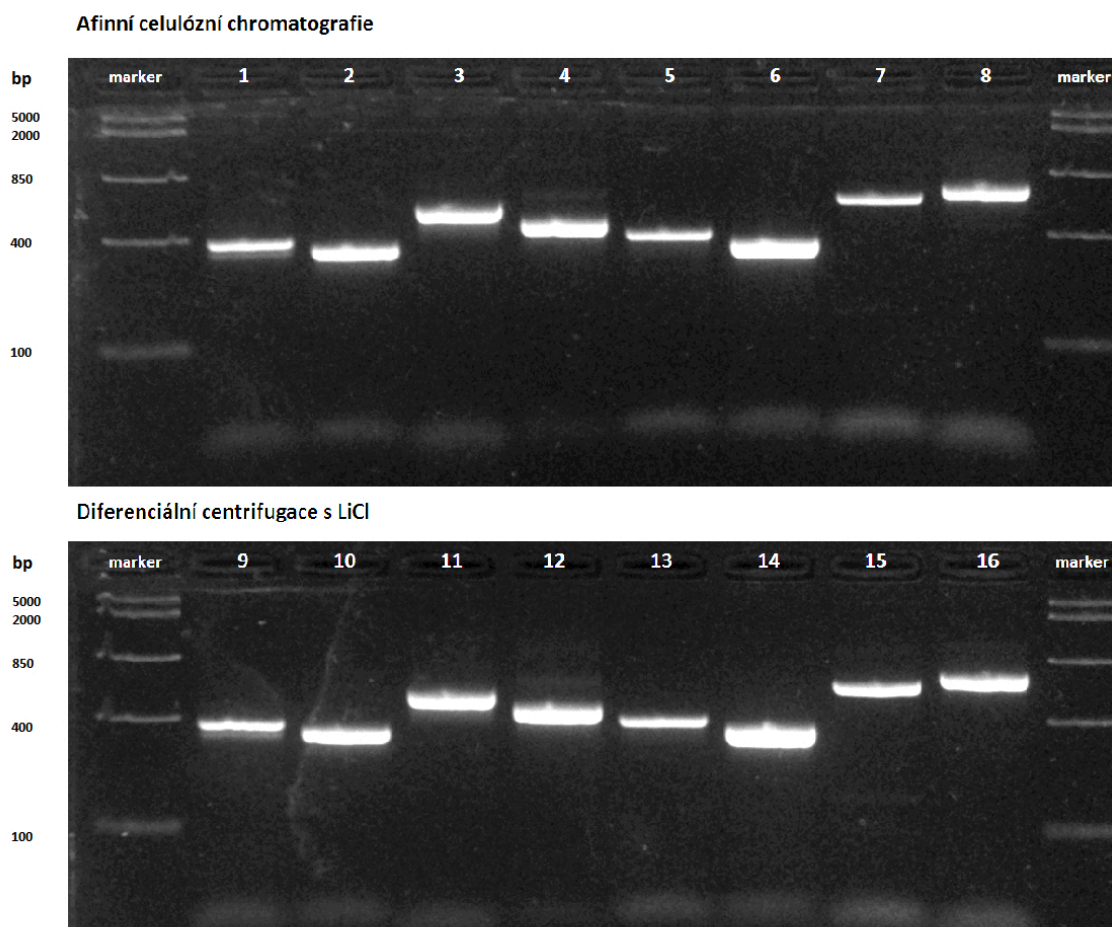
Tabulka 7: Koncentrace jednotlivých extraktů RNA měřené pomocí NanoDropu

RNA extrakt	Metoda	
	afinní celulózní chromatografie	diferenciální centrifugace s LiCl
opakování 1	93,0 ng/μl	94,5 ng/ μl
opakování 2	45,3 ng/μl	106,9 ng/ μl
opakování 3	68,8 ng/ μl	101,8 ng/ μl

(zdroj: vlastní)

5.2 Testování kvalitativního profilu metodou RT-PCR

Dvě komplementární cDNA (jedna cDNA CEL a jedna cDNA LIT) byly testovány osmi sadami primerů pro amplifikaci fragmentů jednotlivých virů pomocí metody RT-PCR. Přítomnost virových fragmentů byla ověřena pomocí gelové elektroforézy. Foto z gelové elektroforézy je na obrázku 7. Velikosti jednotlivých bandů byly porovnány s velikostmi ampliconů uvedených v tabulce 4 a byly vyhodnoceny jako pozitivní.

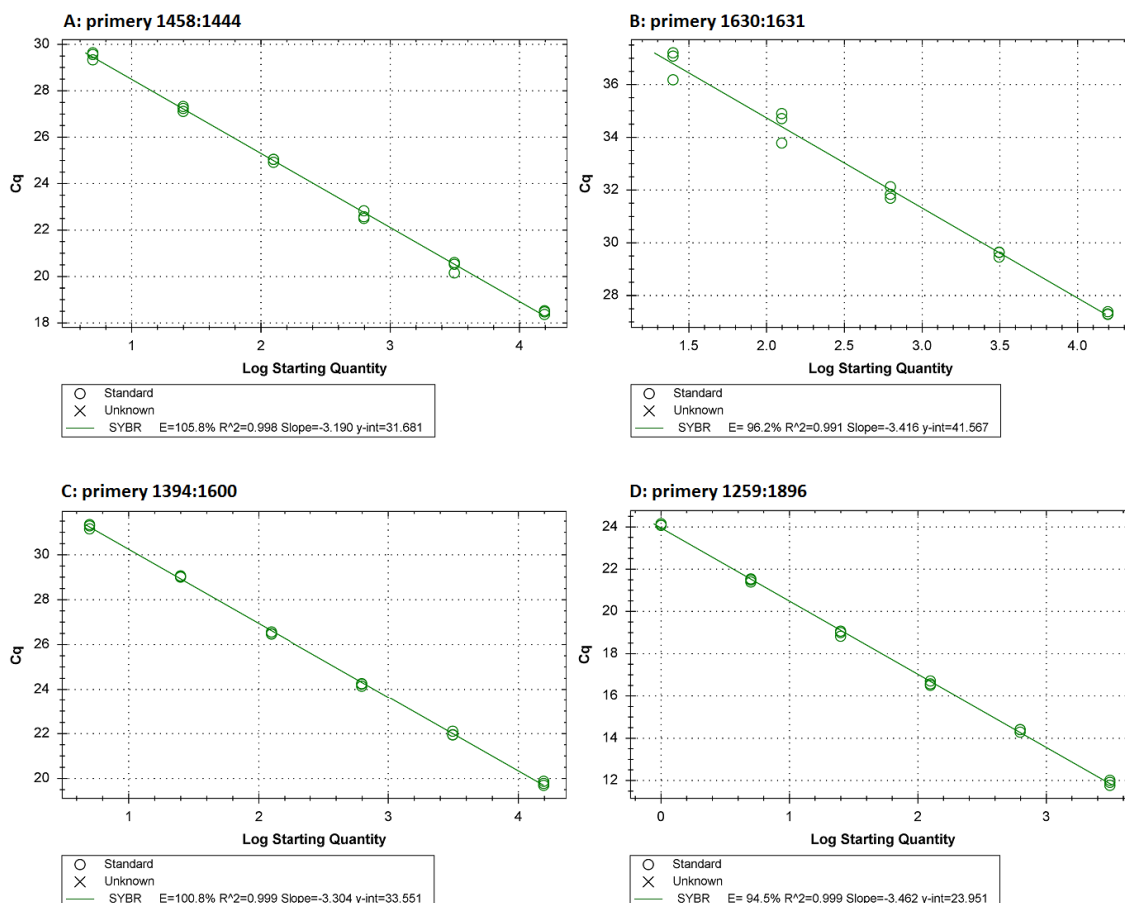


Obrázek 7: Agarózový gel zobrazující kvalitativní profil jednotlivých metod

- 1, 9 – *Red clover enamovirus 1*
 2, 10 – *Chickpea chlorotic stunt virus*
 3, 11 – *Soybean dwarf virus*
 4, 12 – *Red clover enamovirus 2*
 5, 13 – *Red clover cryptic virus 1*
 6, 14 – *Red clover torradovirus 1*
 7, 15 – *Red clover RNA virus 1*
 8, 16 – *Red clover associated varicosavirus*
 (zdroj: vlastní)

5.3 Testování kvantitativního profilu metodou RT-qPCR

Aby byla kvantifikace přesnější, bylo třeba zohlednit efektivitu PCR reakce při použití jednotlivých sad primerů. Efektivita reakce byla softwarem Biorad CFX Manager 3.1 vyhodnocena ze standardních křivek. Efektivita reakcí pro všechny sady primerů se pohybovaly v rozmezí 94,5 % až 105,8 %. Jednotlivé hodnoty jsou na obrázku 8, kde jsou zobrazeny standardní křivky pro všechny sady primerů.



Obrázek 8: Efektivita PCR reakce

A: primery 1458:1444 pro *Red clover enamovirus 1*
 B: primery 1630:1631 pro *Red clover cryptic virus 1*
 C: primery 1394:1600 pro *Red clover associated varicosavirus*
 D: primery 1259:1896 pro *26S ribozomální RNA*
 (zdroj: vlastní)

Dalším měřením byla získána data pro kvantifikaci jednotlivých analytů. Pro účely této práce bylo plně dostačující provést relativní kvantifikaci. Pomocí softwaru Biorad CFX Manager 3.1 byla vyhodnocena tzv. normalizovaná exprese $\Delta\Delta Ct$, která udává relativní kvantitu cíle normalizovanou k referenční kontrole v sledovaném vzorku. Software tato data vyhodnocuje podle vzorce:

$$\text{normalizovaná exprese}_{GOI} = \frac{RQ_{GOI}}{RQ_{Ref}}$$

- RQ = relativní kvantita,
- GOI = zájmový gen (Gene of Interest),
- Ref = referenční kontrola.

Hodnoty relativní kvantity ΔCt jsou vyhodnocovány podle vzorce:

$$\text{relativní kvantita}_{VZOREK(GOI)} = E_{GOI}^{(Ct_{MIN} - Ct_{VZOREK})}$$

- E = efektivita sady primerů, kde efektivita je upravena vzorcem ($\% \text{ efektivita} * 0,01) + 1$, kde 100 % efektivita = 2,
- Ct MIN = průměr Ct vzorku s nejnižším průměrem Ct pro GOI,
- Ct VZOREK = průměr Ct pro vzorek,
- GOI = zájmový gen (Gene of Interest).

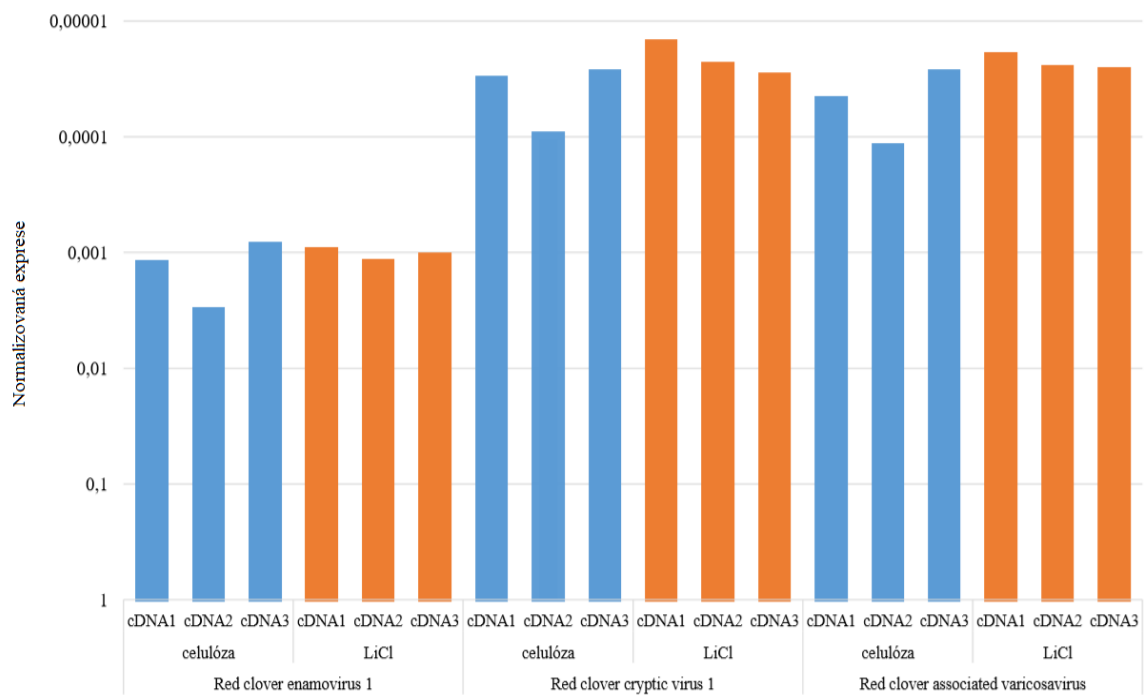
Získaná data byla analyzována dvěma statistickými testy. Výsledky jsou doloženy v tabulce 8.

Tabulka 8: Hodnoty normalizované exprese a jejich analýza statistickými testy

Virus		normalizovaná exprese		p-hodnota	
		celulóza	LiCl	F-test	T-test
Red clover enamovirus 1	cDNA1	0,0013778	0,0010539	0,021	0,438
	cDNA2	0,0035386	0,0013352		
	cDNA3	0,0009619	0,0011830		
Red clover cryptic virus 1	cDNA1	0,0000353	0,0000169	0,072	0,265
	cDNA2	0,0001058	0,0000265		
	cDNA3	0,0000310	0,0000330		
Red clover associated varicosavirus	cDNA1	0,0000525	0,0000221	0,010	0,282
	cDNA2	0,0001350	0,0000283		
	cDNA3	0,0000310	0,0000294		

(zdroj: vlastní)

Data pro normalizovanou expresi byla vynesena do grafu, který je zobrazen na obrázku 9. Vzhledem k tomu, že mezi daty pro red clover enamovirus 1 a ostatními daty byl výrazný rozdíl, bylo na ose Y použito logaritmické měřítko s hodnotami v obráceném pořadí.



Obrázek 9: Graf zobrazující hodnoty normalizované exprese pro jednotlivé při použití afinní celulózní chromatografie a diferenciální centrifugace s LiCl (zdroj: vlastní)

6. Diskuse

Při diagnostice rostlinných patogenů pomocí HTS je prakticky využito minimum dat získaných z celkového množství čtení. Je to dáno tím, že většina nukleových kyselin obsažených ve vstupním materiálu pro sekvenování je rostlinného původu. Je tedy vhodné provést taková opatření, aby došlo k obohacení vstupního materiálu ve prospěch virových nukleových kyselin. Tato práce vznikala s myšlenkou, že metodu afinní celulózní chromatografie lze nahradit metodou diferenciální centrifugace s LiCl.

Aby bylo možné obě metody porovnat, bylo potřeba zajistit stejné kvantitativní a kvalitativní zastoupení všech zkoumaných virů v počátečním materiálu. Jako vhodný kandidát pro testování byla vybrána rostlina jetele lučního (*Trifolium pratense* L.) s označením HZ2. Z několika listů rostliny byl vytvořen jeden směsný vzorek a z něj byly připraveny alikvóty pro další postupy. Tato rostlina byla v minulosti analyzována pomocí HTS (Koloniuk et al., 2018), a tak již byla k dispozici data jednotlivých virů spolu s primery vhodnými pro testování kvalitativního profilu pomocí RT-PCR a kvantitativního profilu pomocí RT-qPCR.

Prvním krokem bylo získat extrakty RNA obohacené o dvouvláknové frakce z připravených alikvót pomocí dvou testovaných metod. První testovanou metodou byla afinní celulózní chromatografie. Tato metoda už ve svém originálním provedení od Morris et Dodds (1979) a Valverde et al. (1986) pracovala s malým množstvím vstupního materiálu. Oproti tomu metoda využívající diferenciální centrifugaci s LiCl od Diaz-Ruiz et Kaper (1978) byla původně provedena ve stonásobném množství vstupního materiálu a tuto metodu bylo potřeba výrazněji upravit pro potřeby této práce.

Oběma metodami se podařilo získat extrakty ribonukleové kyseliny, které po odstranění kontaminující DNA měly koncentraci v rozmezí 45,3 až 106,9 ng/μl. Jednotlivé extrakty byly převedeny do komplementární cDNA a byly použity pro další testování. Důležité bylo použít jednotné množství nukleové kyseliny v rámci jedné metody, aby byla zajištěna homogenita srovnávaných dat.

Testování kvalitativního profilu bylo provedeno s jednou cDNA z každé metody pomocí RT-PCR. Vzorky byly testovány na přítomnost osmi virů nalezených v minulosti pomocí HTS. Po proběhnutí gelové elektroforézy bylo provedeno vizuální vyhodnocení testu.

Ze snímků je patrné, že byla detekována přítomnost všech sledovaných virů. Lze tedy říci, že kvalitativní profil obou metod je shodný.

Kvantitativní profil byl testován metodou RT-qPCR s relativní kvantifikací. Pro testování byly vybrány tři RNA viry (ss(+)RNA, ss(-)RNA, dsRNA genom). Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí softwaru Biorad CFX Manger 3.1. Pro přesnější kvantifikaci byla u jednotlivých sad primerů ověřena efektivita PCR, která se pohybovala od 94,5 % do 105,8 %. Po vlastním testování software vyhodnotil tzv. normalizovanou expresi, která udává relativní kvantitu jednotlivých virů normalizovanou k referenční kontrole 26S ribozomální RNA. Tato data z obou sledovaných skupin byla porovnána mezi sebou pomocí parametrických testů pro každý virus samostatně.

Nejprve byla data testována Fisherovým F-testem s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Tímto testem lze porovnat rozptyly hodnot normalizované exprese porovnávaných skupin a zjistit, zda je mezi těmito daty signifikantní rozdíl. Test ukázal, že data pro red clover enamovirus 1 a pro red clover associated varicosavirus nebyla homogenní.

Dále byla data testována T-testem s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Testem lze určit, zda mezi výběrovými průměry u sledovaných skupin je anebo není signifikantní rozdíl. Nejprve byla určena nulová a alternativní hypotéza:

- H_0 : Při použití metody afinní celulózní chromatografie a diferenciální centrifugace s LiCl je poměr mezi 26S ribozomální RNA a virovou RNA stejný.
- H_1 : Poměr mezi 26S ribozomální RNA a virovou RNA je při použití metody afinní celulózní chromatografie a diferenciální centrifugace s LiCl odlišný.

Test ukázal, že mezi metodami není signifikantní rozdíl a potvrdil nulovou hypotézu. Jestliže mezi testovanými metodami není signifikantní rozdíl, znamená to, že metoda s diferenciální centrifugací s LiCl není výrazně lepší nebo horší než v současnosti využívaná metoda afinní celulózní chromatografie. Z výsledků uvedených v tabulce 8 a grafu na obrázku 11 lze ale říci, že metoda s LiCl ve srovnání s druhou metodou poskytovala více homogenní data.

7. Závěr

V diagnostice rostlinných patogenů nachází masivně paralelní sekvenování výrazné uplatnění. Pro přípravu vstupního materiálu lze využít více druhů metod podle účelu použití. Cílem této práce bylo porovnat kvalitativní a kvantitativní profil metody afinní celulózní chromatografie a metody s diferenciální centrifugací s LiCl, z nichž první uvedená se v současnosti využívá k výše uvedeným účelům. Pro kvalitativní a kvantitativní testování byla vybrána rostlina jetele lučního (*Trifolium pratense* L.), která byla infikována RNA viry s jednovláknovými a dvouvláknovými genomy. Uvedenými metodami byly z rostliny získány extrakty ribonukleové kyseliny. Pomocí metody PCR bylo zjištěn kvalitativní profil obou metod. S využitím metody Real-Time PCR s relativní kvantifikací byl vyhodnocen kvantitativní profil obou metod. Z hlediska kvality lze konstatovat, že obě metody poskytly shodné výsledky. Po vyhodnocení kvantifikačních dat pomocí softwaru Biorad CFX Manager 3.1 a provedení statistických testů lze konstatovat, že mezi porovnávanými metodami nebyl signifikantní rozdíl, avšak metoda s diferenciální centrifugací s LiCl poskytovala více homogenní data. Pro využití této metody pro přípravu vstupního materiálu pro vysokokapacitní sekvenování by bylo nutné další testování například na přítomnost zbytkového lithia, které by mohlo v navazujících postupech působit jako inhibitor.

Seznam zdrojů

1. ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2006. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing. 756 s. ISBN 80-902906-2-0.
2. ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science. 1463 s. ISBN 0-8153-4072-9.
3. BARBAS, C. F., BURTON, D. R., SCOTT, J. K., SILVERMAN, G. J., 2010. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2007(11) [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.1101/pdb.ip47. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.ip47>
4. BENNETT, C. W., 1969. Seed Transmission of Plant Viruses. *Advances in Virus Research* [online]. 14, 221-261 [cit. 2018-12-27]. DOI: 10.1016/S0065-3527(08)60561-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352708605618>
5. CELER, V., CELER, V., 2010. *Obecná virologie*. Hradec Králové: Nucleus HK. 143 s. ISBN 9788087009703.
6. CLARK, D. P., PAZDERNIK, N. J., 2013. *Molecular biology: [academic cell]*. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier, 907 s. ISBN 9780123785947.
7. CLARK, M. F., ADAMS, A. N., 1976. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology* [online]. 34(3), 475-483 [cit. 2018-12-27]. DOI: 10.1099/0022-1317-34-3-475. Dostupné z: <https://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-34-3-475>

8. DESHMUKH, V. P., THAKARE, P. V., CHAUDHARI, U. S., GAWANDE, P. A., 2007. A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Arnot. *Electronic Journal of Biotechnology* [online].10(3) [cit. 2019-01-01]. DOI: 10.2225/vol10-issue3-fulltext-5. ISSN 07173458. Dostupné z: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue3/full/5/index.html>
9. DIAZ-RUIZ, J. R., KAPER, J. M., 1978. Isolation of viral double-stranded RNAs using a LiCl fractionation procedure. *Preparative Biochemistry* [online]. 8(1), 1-17 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1080/00327487808068215. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00327487808068215>
10. DIJKSTRA, J., KHAN, J. A., 2006. Mechanical Transmission of Plant Viruses. In: KHAN, J. A., DIJKSTRA, J. (eds). *Handbook of plant virology*. New York: Food Products Press, s. 137-144. ISBN 9781560229797.
11. GARIBYAN, L., AVASHIA, N., 2013. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 133(3), 1-4 [cit. 2019-01-03]. DOI: 10.1038/jid.2013.1. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>
12. GIBBS, M. J., KOGA, R., MORIYAMA, H., PFEIFFER, P., FUKUHARA, T., 2000. Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single-stranded RNA virus. *Journal of General Virology* [online]. 81(1), 227-233 [cit. 2018-12-09]. DOI: 10.1099/0022-1317-81-1-227. Dostupné z: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-81-1-227>
13. GUTIERREZ, C., 2006. Replication and gene expression of DNA viruses. In: KHAN, J. A., DIJKSTRA, J. (eds). *Handbook of plant virology*. New York: Food Products Press, s. 75-91. ISBN 9781560229797.
14. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., 2002. *Základy imunologie*. 2. vydání. Praha: Triton. 260 s. ISBN 807254215x.

15. HULL, R., 2009. *Comparative plant virology*. 2nd edition. Boston: Elsevier/Academic Press, 376 s. ISBN 9780123741547.
16. CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* [online]. 1(2), 581-585 [cit. 2019-01-01]. DOI: 10.1038/nprot.2006.83. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2006.83>
17. KAZDA, J., MIKULKA, J., PROKINOVÁ, E., 2010. *Encyklopedie ochrany rostlin*. Praha: Profi Press s. r. o., 399 s. ISBN 9788086726342.
18. KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B., Lefkowitz, E. J. (eds), 2011. *Virus taxonomy: Ninth report of the International committee on taxonomy of viruses*. Waltham, MA: Elsevier Academic Press, 1338 s. ISBN 978012384684-6.
19. KÖHLER, G., MILSTEIN, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* [online]. 256(5517), 495-497 [cit. 2018-12-29]. DOI: 10.1038/256495a0. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/256495a0>
20. KOLONIUK, I., 2017. *HTS sekvenční data vzorku HZ2*. Interní materiál oddělení rostlinné virologie, Biologické centrum AV ČR v. v. i. České Budějovice.
21. KOLONIUK, I., FRÁNOVÁ, J., SARKISOVA, T., PŘIBYLOVÁ, J., LENZ, O., PETRZIK, K., ŠPAK, J., 2018. Identification and molecular characterization of a novel varicosa-like virus from red clover. *Archives of Virology* [online]. 163(8), 2213-2218 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1007/s00705-018-3838-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-018-3838-2>
22. KOUBKOVÁ, L., VOJTĚŠEK, B., VYZULA, R., 2014. Next generation sequencing – application in clinical practice. *Klinická onkologie* [online]. 27(1), 61-68 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.14735/amko20141S61. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4484/>

23. KREJČÍ, A., MÜLLER, P., VOJTĚŠEK, B., 2015. Bioinformatics and Next - generation sequencing. *Klinická onkologie* [online]. 28(2), 91-96 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.14735/amko20152S91. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4764/>
24. KŮDELA, V., BARTOŠ, P., ČAČA, Z., 1989. *Obecná fytopatologie*. Praha: Academia, 387 s. ISBN 8020001565.
25. LIMA, J. A. A., NASCIMENTO, A. K. Q., RADAELLI, P., PURCIFULL, D. E., 2012. Serology applied to plant virology. In: AL-MOSLIH, M. (ed.). *Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases*. Rijeka: InTech, s.71-94. ISBN 9789535103707.
26. LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data Using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* [online]. 25(4), 402-408 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>
27. MASSART, S., OLMOS, A., JIJAKLI, H., CANDRESSE, T., 2014. Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research* [online]. 188, 90-96 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.03.029. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016817021400149X>
28. MAXAM, A. M., GILBERT, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 74(2), 560-564 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1073/pnas.74.2.560. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.74.2.560>
29. MOMMAERTS, K., SANCHEZ, I., BETSOU, F., MATHIESON, W., 2015. Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Analytical Biochemistry* [online]. 479, 51-53 [cit. 2019-01-01]. DOI: 10.1016/j.ab.2015.03.027. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269715001359>
30. MORALES, F. J., 2006. Detection and identification of plant viruses and disease diagnosis. In: KHAN, J. A., DIJKSTRA, J. (eds). *Handbook of plant virology*. New York: Food Products Press, s.157-169. ISBN 9781560229797.

31. MORRIS, T. J., DODDS, J. A., 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* [online]. 69(8), 854-858 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1094/Phyto-69-854. Dostupné z: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1979Articles/Phyto69n08_854.PDF
32. MULLIS, K. B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* [online]. 262(4), 56-65 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0490-56>
33. MUSIL, M., LEŠKOVÁ, O., KVÍČALA, B. A., 1981. *Diagnostika vírusov strukovín a d'atelinovín*. Bratislava: Veda, 176 s.
34. NAVRÁTIL, M., 2011. *Základy virologie: obecná virologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 100 s. ISBN 9788024428239.
35. NEBESÁŘOVÁ, J., 2001. *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. [cit. 2018-12-30]. Dostupné z: <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/Podkap/1.0.html>
36. NEČAS, Oldřich, 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přepracované vydání. Jinočany: H & H, 554 s. ISBN 8086022463.
37. PETRZIK, K., 1999. *Molekulární biologie a biotechnologie rostlinných virů*. České Budějovice: Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR. 96 s.
38. PFAFFL, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* [online]. 29(9), 45e-45 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.9.e45>
39. ROD, J., 2017. *Choroby a škůdci na zahradě: identifikace, prevence a ochrana*. Praha: Grada Publishing, 160 s. ISBN 8027197538

40. ROSYPAL, Stanislav, 2002. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. inovované vydání. Brno: Stanislav Rosypal, Grafex. 300 s. ISBN 8090256244.
41. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W., 2010. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol: Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2006(1) [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1101/pdb.prot4455. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot4455>
42. SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 74(12), 5463–5467 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431765/?page=1>
43. SANSCHAGRIN, S. YERGEAU, E., 2014. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (90) [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.3791/51709. Dostupné z: <http://www.jove.com/video/51709/next-generation-sequencing-of-16s-ribosomal-rna-gene-amplicons>
44. SMITH, K. M., 1977. *Plant Viruses*. 6th edition. Dordrecht: Springer Netherlands. 268 s. ISBN 978-0-412-14740-1.
45. ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J., 2008. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 188 s. ISBN 9788021038417.
46. TAYLOR, S., WAKEM, M., DIJKMAN, G., ALSARRAJ, M., NGUYEN, M., 2010. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* [online]. 50(4), 1-5 [cit. 2019-04-01]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202310000204>

47. VALASEK, M. A., REPA, J. J., 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* [online]. 29(3), 151-159 [cit. 2019-01-03]. DOI: 10.1152/advan.00019.2005. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/advan.00019.2005>
48. VALVERDE, R. A., DODDS, J. A., HEICK, J. A., 1986. Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology* [online]. 76(4), 459-465 [cit. 2019-03-26]. DOI: 10.1094/Phyto-76-459. Dostupné z: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n04_459.PDF
49. VANGUILDER, H. D., VRANA, K. E., FREEMAN, W. M., 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* [online]. 44(5), 619-626 [cit. 2019-01-03]. DOI: 10.2144/000112776. Dostupné z: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000112776>
50. VIDHYASEKARAN, P., 2004. *Concise encyclopedia of plant pathology*. New York: Food Products Press, 642 s. ISBN 9781560229438.

Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Sérologický vztah virů a jejich kmenů</i>	16
Obrázek 2: <i>Přímá a nepřímá ELISA</i>	17
Obrázek 3: <i>Graf sumarizované distribuce čtení získaných sekvenováním rostliny HZ2</i>	25
Obrázek 4: <i>Rostlina HZ2 versus zdravá kontrola</i>	26
Obrázek 5: <i>Rozložení vzorků na PCR destičce při měření efektivity PCR</i>	37
Obrázek 6: <i>Uspořádání vzorků na PCR destičce při kvantitativním měření</i>	38
Obrázek 7: <i>Agarózový gel zobrazující kvalitativní profil jednotlivých metod</i>	40
Obrázek 8: <i>Efektivita PCR reakce</i>	41
Obrázek 9: <i>Graf zobrazující hodnoty normalizované exprese pro jednotlivé při použití afinní celulózní chromatografie a diferenciální centrifugace s LiCl</i>	43

Seznam tabulek

Tabulka 1: <i>Přehled virů nalezených v rostlině HZ2</i>	27
Tabulka 2: <i>Reakční mix pro přípravu cDNA</i>	32
Tabulka 3: <i>Reakční mix pro přípravu PCR reakce</i>	33
Tabulka 4: <i>Detekční primery pro jednotlivé viry</i>	34
Tabulka 5: <i>Primery pro kvantifikaci pomocí RT-qPCR</i>	35
Tabulka 6: <i>Reakční mix pro RT-qPCR</i>	37
Tabulka 7: <i>Koncentrace jednotlivých extraktů RNA měřené pomocí NanoDropu</i>	39
Tabulka 8: <i>Hodnoty normalizované exprese a jejich analýza statistickými testy</i>	42

Seznam použitých zkratek

Ab	Protilátka
bp	komplementární pár bází
cDNA	komplementární DNA
cDNA CEL	cDNA získaná z metody s celulózou
cDNA LIT	cDNA získaná z metody s LiCl
Ct	cyklus prahu
ddNTP	Dideoxyribonukleotid
DEPC	diethyl pyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová DNA
dsRNA	dvouvláknová RNA
ELISA	z angl. Enzyme-linked immunosorbent assay
HTS	masivně paralelní sekvenování
HZ2	označení vzorku podle místa původu (Hladké Životice)
ICTV	Mezinárodní komise pro taxonomii virů
mRNA	messenger RNA
NoRT	kontrola bez reverzní transkriptázy
NTC	beztemplátová kontrola
OH	hydroxylová skupina
ORF	otevřený čtecí rámeček
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomální RNA
SDS	dodecylsírany sodný
ssDNA	jednovláknová DNA
ssRNA	jednovláknová RNA
STE pufr	extrakční pufr (Sodium Chloride-Tris-EDTA)
TBE pufr	elektroforetický pufr (Tris-Borate-EDTA)
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
UV	ultrafialové záření
VANA	nukleová kyselina asociovaná s virionem
26S rRNA	ribozomální RNA z velké podjednotky rostlinného ribozomu