

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Detekce vybraných rostlinných virů mikročipy
(microarrays)

Diplomová práce

Bc. Lenka Hrabáková

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Karel Petrzik, CSc.

ÚMBR BC AVČR, v.v.i.

České Budějovice 2013

Hrabáková L., 2013: Detekce vybraných rostlinných virů mikročipy (microarrays) [Detection of selected plant viruses by microarrays]. – Master Thesis (in Czech), 48 p., Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: The main aim of this master thesis was the simultaneous detection of four selected plant viruses – Apple mosaic virus, Plum pox virus, Prunus necrotic ringspot virus and Prune dwarf virus, by microarrays. The intermediate step in the process of the detection was optimizing of multiplex polymerase chain reaction (PCR).

Key words: Plum pox virus, Prunus necrotic ringspot virus, Apple mosaic virus, Prune dwarf virus, microarrays

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Poděkování

Ráda bych v první řadě chtěla poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Karlu Petrzikovi, CSc. a zároveň i Mgr. Ondřeji Lenzovi, Ph.D. za jejich trpělivost, podporu, cenné rady a připomínky k této práci. Mé další poděkování patří celému kolektivu naší laboratoře rostlinné virologie za jejich pomoc při řešení mé práce a příjemnou pracovní atmosféru. A v neposlední řadě děkuji svým rodičům a přátelům, že mne ve všem podporují.

Obsah

1. Úvod.....	1
1. 1 Virus šarky švestky - Plum pox virus (PPV).....	2
1. 2 Virus mozaiky jabloně – Apple mosaic virus (ApMV)	4
1. 3 Virus nekrotické kroužkovitosti slivoně – Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)	6
1. 4 Virus zakrslosti slivoně – Prune dwarf virus (PDV).....	8
1. 5 Mikročipy - Microarrays	9
2. Cíle práce	16
3. Materiál a metody	17
3.1 Rostlinný materiál	17
3.2 Izolace RNA	17
3.2.1 Izolace RNA	17
3.2.2 Izolace dsRNA	17
3.3 Primery	18
3.4 Reverzní transkripce	20
3.5 PCR reakce	21
3.6 Elektroforéza DNA na agarovém gelu	22
3.7 Sekvenování	22
3.8 Hybridizace na mikročip	23
4. Výsledky	24
4.1 RT-PCR detekce virů ovocných stromů ApMV, PDV, PPV, PNRSV	24
4. 2 Detekce amplikonů na mikročipu.....	27
4.3 Specifita mikročipu a návrh nových kotev	30

5. Diskuze.....	31
6. Závěr	35
7. Seznam použitých zkratk	36
8. Citovaná literatura.....	37
9. Přílohy.....	45
9.1 Primery	45
9.2 Rozpis programů PCR reakce pro jednotlivé viry.....	46
9.3 Pozice jednotlivých kotev na mikročipu	47
9.4 Sekvence jednotlivých kotev na používaném mikročipu	48

1. Úvod

Vybrané rostlinné viry - virus mozaiky jabloně, virus nekrotické kroužkovitosti slivoně, virus zakrslosti slivoně a virus šarky švestky, způsobují značné škody, které mají dopad nejen zemědělský, ale také ekonomický. Vlivem infekce viry dochází k výraznému snižování produkce plodů, jejich kvality a postupně dochází až k úhynu napadených stromů.

Tyto viry se vyskytují se téměř celosvětově a většina z těchto virů ovocných stromů a dalších rostlin, hlavně z čeledi *Prunus* spp., jsou přenášeny jak vektory, tak i pylem či semeny. Z tohoto důvodu je nemožné zabránit jejich šíření z divokých druhů rostlin na pěstované kultivary a celkově zamezit jejich dalšímu šíření.

V současné době je kladen velký důraz nejen na pěstování a používání viruprostých řízků a podnoží, ale i na snadnou detekci těchto virů, aby se zamezilo nechtěnému šíření mezi pěstiteli a sadaři. Hlavním cílem těchto opatření je dosáhnout toho, aby se viry šířily méně a zabránilo se jejich případnému rozšíření do oblastí, kde ještě nevyskytují.

K detekci virové infekce se velmi často využívá metody ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay), kdy se používají specifické protilátky proti určitému viru. S rozvojem metod molekulární biologie se začala rozvíjet rutinní detekce pomocí PCR u DNA virů, popř. RT-PCR u RNA virů.

Cílem mé práce bylo ověřit fungování metody, která by usnadnila společnou detekci těchto vybraných čtyř virů za použití Cy3 značených univerzálních primerů. Tato metoda měla umožnit jejich společnou amplifikaci s fluorescenčním značením pro následnou detekci mikročipy. Námi používané mikročipy jsou navrženy tak, aby umožnily zároveň detekci i dalších RNA virů a fytoplazem.

1. 1 Virus šarky švestky - Plum pox virus (PPV)

Virus šarky švestky patří mezi jednořetězcové (+) RNA viry a je řazen do rodu Potyvirus a čeledi *Potyviridae*. Velikost genomu viru je 10 kb, jeho uspořádání je zobrazeno na následujícím obrázku (Obr. 1). Obsahuje 1 otevřený čtecí rámec (ORF), ze kterého je autokatalyticky vyštěpováno 10 peptidů, včetně jednoho strukturního. Virové částice jsou vláknité o velikosti přibližně 750 x 15 nm.



Obr. 1: Uspořádání genomu viru šarky švestky (upraveno dle Chen et al., 2005).

Tento virus, který způsobuje onemocnění česky nazývané šarka švestky, byl poprvé objeven v roce 1915 v Bulharsku (Atanasoff, 1932), v České republice byl popsán až na počátku 40. let 20. století (Navrátil, 2006). V současné době je již onemocnění rozšířeno po celém světě s výjimkou Švédska, Austrálie, Nového Zélandu a Jihoafrické republiky (Barba et al., 2011).

Způsobuje značné škody v zemědělství, zejména snížení výnosu plodů, snižování kondice (fitness) stromů a předčasné odumírání napadených stromů. K šíření viru dochází mechanickým a vegetativním přenosem, dochází i k neperzistentnímu přenosu mšicemi. Jako jediný z vybraných virů není PPV nepřenášen semeny.

Příznaky onemocnění šarky švestky se liší v závislosti na hostiteli, od chlorotických skvrn na listech až po deformace plodů (Obr. 2). Hostiteli viru šarky švestky jsou nejen ovocné stromy rodu *Prunus* a jejich okrasné formy, ale virus se vyskytuje například i na vlašském ořechu (*Juglans regia*), trnce obecné (*Prunus spinosa*), brslenu evropském (*Euonymus europaeus*) a myrobalánu třešňovém (*Prunus cerasifera*) (Polák, 2006).

Intenzita příznaků není přímo úměrná koncentraci viru PPV, či konkrétně jeho CP v infikovaných buňkách (Šubr & Glasa, 2008).



Obr. 2: Příznaky onemocnění šarky švestky, kmene PPV-M, na květech a plodech broskvoně (převzato z PQR – EPPO database on quarantine pests, www.eppo.int).

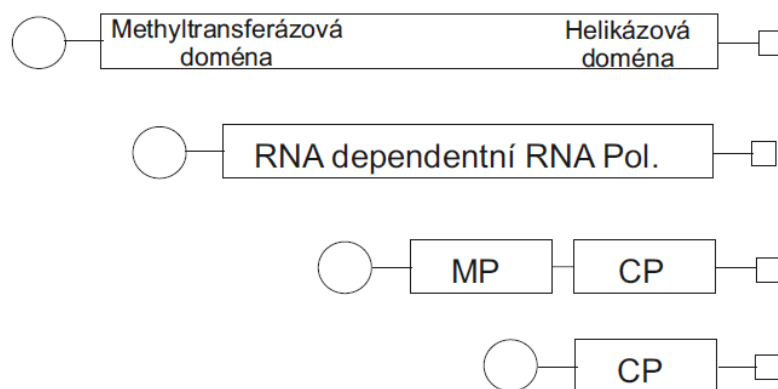
Bylo prokázáno, že k nákaze virem šarky jsou nejvíce náchylné tříleté stromy, a zvýšená míra infekce byla prokázána i v letech, které jsou charakterizovány teplým obdobím na počátku vegetačního období (Navrátil, 2006). Šíření viru šarky švestky má určitou souvislost s globálním oteplováním: během let se onemocnění rozšířilo z nížin, přes podhůří až do přibližné nadmořské výšky kolem 800 m. n. m. (Polák, 2009).

V současné době je popsáno celkem 6 kmenů viru šarky švestky: PPV-D (Dideron), PPV-M (Marcus), PPV-EA (El Amar), PPV-C (Cherry), PPV-W (Winona) a PPV-Rec (Recombinant), které se liší v druzích hostitelských rostlin a některých svých biologických vlastnostech. Kmen PPV-C je jediným kmenem PPV, který napadá třešně, a mezi další jeho hostitelské rostliny patří ostatní ovocné stromy. Třešně jsou odolné k infekcím vyvolávané ostatními kmeny (Pasquini et al., 2008). Přestože kmen PPV-C je jediným kmenem napadajícím třešně, v České republice ještě nebyl objeven. Podobně jako další dva kmeny tohoto viru: PPV-EA, PPV-W (Polák & Komínek, 2009). Naopak nejvíce rozšířeným kmenem ve střední Evropě je kmen PPV-D (Polák, 2009). Rekombinací tohoto kmenu s kmenem PPV-M, vzniká kmen PPV-Rec (Glasa et al., 2004).

Dosud nebyl zaznamenán případ, ve kterém by docházelo k směsné infekci různými kmeny (Polák & Komínek, 2009). Nežádka se naopak vyskytují koinfekce viru PPV s virem nekrotické kroužkovitosti slivoně (PNRSV) či virem zakrslosti slivoně (PDV).

1. 2 Virus mozaiky jabloně – Apple mosaic virus (ApMV)

Virus mozaiky jabloně se řadí do rodu *Illarvirus* a čeledi *Bromoviridae*. Jedná se o jednořetězcový RNA (+) virus, jehož částice jsou sférické s průměrem 26 nm. Genom je složený ze tří částí a obsahuje jednu subgenomovou RNA4, bez které by virus nebyl infekční (Shiel & Berger, 1995). Organizace genomu ApMV je uvedena na dalším obrázku (Obr. 3).



Obr. 3: Organizace genomu viru ApMV (upraveno dle Lenz, 2001).

Virus je rozšířen celosvětově, napadá nejen jabloně (*Malus*), ale i peckoviny – meruňky (*Prunus armeniaca*), broskvoně (*Prunus persica*), mandloně (*Amygdalus communis*) (Matic et al, 2008), ale například i hrušně (*Pyrus communis*) (Petrzik, 2005) chmel (*Humulus lupulus*), ostružiny (*Rubus*), maliny (*Rubus idaeus*), jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia*), břízu bradavičnatou (*Betula pendula*), kaštiny (*Aesculus hippocastanum*, *A. carnea*, *A. flava*, *A. parviflora*) (Grimová et al, 2013).

ApMV se rozděluje do 3 skupin podle svých hostitelů. První skupina má jako své hostitele jabloně, hrušně a symbiotickou řasu lišejníků *Trebouxia*, druhá rostliny rodu *Prunus*, chmel a další dřeviny. Třetí skupina izolátů viru se vyskytuje jen v jahodnicích (Grimová et al., 2013). Na následujícím obrázku jsou ukázky onemocnění způsobené ApMV u jednotlivých skupin (Obr. 4).



Obr. 4: Příznaky onemocnění způsobené virem ApMV na listech jabloně, chmele a jahodníku (převzato z <http://utahpests.usu.edu>, <http://www.insectimages.org>, <http://www.apsnet.org/>)

V nedávné době bylo ApMV nalezeno v dalších symbiotických řasách lišejníků. Izoláty, které byly objeveny, se fylogeneticky podobají první skupině kmenu ApMV, tedy těm napadajícím jabloně a hrušně. Dosud nebyly objeveny žádné izoláty ApMV v lišejnicích, které by se fylogeneticky řadily do druhé a třetí skupiny (Petřík et al., 2013). Celkově byl prokázán výskyt tohoto viru u 65 druhů vyšších rostlin z devatenácti různých čeledí (Fulton, 1952). K přenosu viru dochází mechanicky i vegetativně roubováním a očkovaním (Paunovic et al., 2011), pravděpodobný, ale dosud neprokázaný, je i přenos pylu. Naopak není znám žádný přenašeč viru mozaiky jabloně a k přenosu asi nedochází ani semeny napadeného stromu.

U jabloní většinou probíhá infekce ApMV latentně, kdy příznaky nejsou znatelné, u růží se nákaza projevuje chlorotickými mozaikami na listech. Koncentrace viru v jabloních je variabilní během roku, nejvyšší koncentrace byla popsána v první polovině roku, konkrétně v době od dubna do června (Matic et al., 2008), v listech a okvětních lístečcích, naopak nejnižší koncentrace viru byla prokázána ve floému a u dormantních pupenů (Svoboda & Polák, 2010).

V České republice je tento virus hojně rozšířen, v některých sadech se infikovanost jabloní pohybuje až okolo 55%. Často se vyskytuje ve směsných infekcích u jabloní s dalšími dvěma viry, které patří do rodu *Flexiviridae* – viru chlorotické skvrnitosti jabloně (Apple chlorotic leaf spot virus - ACLSV) a viru žlábkovitosti kmene jabloně (Apple stem grooving virus - ASGV) (Svoboda & Polák, 2010). Ale frekvence infekcí viru ApMV v porovnání s dvěma předchozími – ACLSV, ASGV, je menší (Petrzik & Lenz, 2011). Virus se podílí i na směsných infekcích s dalšími viry uvedenými v této práci u jejich přirozených hostitelů – virem nekrotické kroužkovitosti slivoně (PNRSV) a virem zakrslosti slivoně (PDV) (Vašková et al., 2000b). Při sérologické detekci může být virus ApMV chybně detekován jako PNRSV (Petrzik & Lenz, 2011).

1. 3 Virus nekrotické kroužkovitosti slivoně – Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)

Virus nekrotické kroužkovitosti slivoně je dalším zástupcem rodu *Iarvirus*, *Bromoviridae*. Onemocnění u třešně způsobené tímto virem je známé pod označením Stecklenberská choroba. Virové částice viru nekrotické kroužkovitosti slivoně jsou isomerické s průměrem okolo 23 nm, genetická informace je obsažena v pozitivně orientované tripartitní RNA. Virus se vyskytuje celosvětově vzhledem k širokému spektru hostitelů jak u ovocných stromů – třešně (*Prunus avium*), višně (*Prunus cerasus*), broskvoně (*Prunus persica*), meruňky (*Prunus armeniaca*), jabloně (*Malus*), švestek (*Prunus domestica*), nebo mandloně (*Amygdalus communis*), tak i dalších dvouděložných rostlin, například růže (*Rosa*) (Moury et al., 2001), chmelu (*Humulus lupulus*), muškátů (*Pelargonium* spp.) (Kulshrestha et al., 2005), či begonií (*Begonia*) (Verma, 2002).

Napadení ovocných stromů virem nekrotické kroužkovitosti slivoně se projevuje například vznikem jasně ohraničených chlorotických skvrn na listech, které následně podléhají nekróze a dochází až k vypadávání takto postižených míst (Obr. 5).



Obr. 5: Příznaky onemocnění způsobené virem PNRSV u třešně (převzato z <http://pnwhandbooks.org>).

K přenosu viru dochází jak mechanicky, tak vegetativně. Virus je přenosný semeny i pylem (George & Davidson, 1963; Amari et al., 2009; Shiller et al., 2010). Prokázán byl i přenos roztočem (*Vasates fockeui*) (Proeseler, 1968) a háďátkem (*Longidorus macrosoma*) (Fritzsche & Kegler, 1968), další přenašeči PNRSV nejsou známy.

PNRSV byl rozdělen na základě testování třešně do dvou patotypů - mírného (M-Mild) způsobující mírné příznaky a patotypu R (R-rugose) vyznačující se vrásčitou mozaikou, a do tří sérotypů – CH 3, CH 9, CH 30 (Mink et al., 1987). Fylogenetické analýzy 159 nukleotidů 3' konce transportního proteinu (MP) viru, které byly provedeny na vzorcích získaných převážně v České republice, rozdělily PNRSV do 3 skupin s jednou podskupinou. První skupinu tvoří vrásčitý (R) patotyp se sérotypem CH 30, obsahující převážně izoláty z třešně. Druhá skupina, zahrnující izoláty převážně ze švestek, višně a mandloně, vyznačuje mírný patotyp sérotypu CH 9. V této skupině je možné fylogeneticky oddělit podskupinu švestek. Poslední skupina je charakterizována sérotypem CH 30. Izoláty této skupiny vykazovaly příbuznost k ApMV, který byl použitý jako kořen fylogenetického stromu (outgroup) (Vašková et al., 2000a).

1. 4 Virus zakrslosti slivoně – Prune dwarf virus (PDV)

Virus zakrslosti slivoně, byl poprvé popsán v roce 1936 v USA, je naším posledním zástupcem patřícím do rodu Ilarvirus a čeledi *Bromoviridae*. Genetická informace viru je nesena tripartitní jednořetězcovou pozitivní RNA. Virové částice jsou isometrické o velikosti 22 nm. Virus se vyskytuje v oblastech, kde jsou pěstovány rostliny rodu *Prunus* spp. a vyskytuje se především na višních (*Prunus cerasus*), třešních (*Prunus avium*), broskvoních (*Prunus persica*), mandloních (*Amygdalus communis*), myrobalánech (*Prunus cerasifera*), slivoních (*Prunus domestica*) a trnkách (*Prunus spinosa*). Často se vyskytuje ve směsných infekcích s virem nekrotické kroužkovitosti slivoně (PNRSV), virem mozaiky jabloně (ApMV) (Vašková et al., 2000b; Fonseca et al., 2005), ale i s virem šarky švestky (PPV).

K přenosu viru dochází mechanicky i vegetativně očkovaním a řízkováním. Virus je u třešni s nízkou pravděpodobností přenášen pylem, ale až s 80 % pravděpodobností se přenáší semeny napadeného stromu. Dosud nebyl objeven žádný přenašeč viru zakrslosti slivoně. Projevy infekce se velmi liší v závislosti na klimatu, hostiteli a typu izolátu viru od latentní, bezpříznakové infekce (Fonseca et al., 2005), až po zakrslost u broskví, chlorotické skvrny na listech třešni a praskání jejich plodů, žloutnutí listů u višni, zakrslost a malformace na listech u švestky (Uyemoto & Scott, 1992; Proebsting et al, 1995). Příznaky onemocnění jsou více znatelné při chladnějším počasí (Obr. 6).

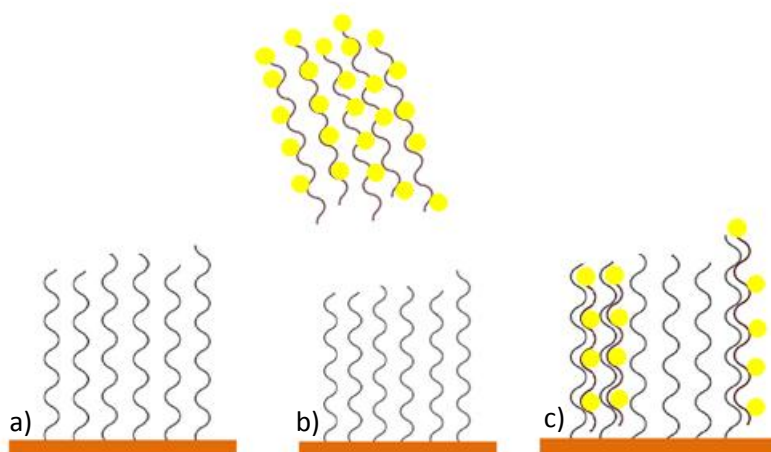


Obr. 6: Chlorotické skvrny na listech třešně způsobené virem PDV (převzato z <http://tilia.zf.mendelu.cz>).

1. 5 Mikročipy - Microarrays

Metoda mikročipů spočívá v hybridizaci značených molekul DNA na specifické kotvy na mikročipu, o délce 25 – 70 bází, které jsou přichycené na mikročipu v námi známém uspořádání (Gallitelli, 2004) (Obr. 7). Poprvé byl mikročip použit v roce 1995 pro měření exprese genů a od té doby se metoda nepřetržitě vyvíjí.

Metoda mikročipů spojila dohromady mnoho genetických a inženýrských oborů jakými jsou molekulární biologie, genetika, chemie nukleových kyselin, výroba miniaturních struktur, technologie mikroobrábění, softwarový vývoj, robotizace a automatizace (Heller, 2002).



Obr. 7: Princip mikročipu využívající začleňování fluorescenčně označených nukleotidů (dNTPs) během syntézy DNA. a) Přípravený mikročip s natištěnými kotvami. b) Hybridizace jednořetězcové DNA se začleněnými fluorescenčně značenými nukleotidy. c) Mikročip se specificky navázanou značenou DNA.

Detekce patogenů pomocí mikročipů je metoda, která se začala využívat teprve nedávno, a doplňuje současně využívané metody sérologické (ELISA), molekulární (PCR/RT-PCR), biologické testování (přenos viru na indikátorové rostliny) či používání elektronového mikroskopu. Na rozdíl od mikročipů, ale tyto zmíněné metody umožňují detekovat pouze omezené množství patogenu.

U ELISA testů je možné detekovat v každé reakci jen jeden patogen. Navíc může být výsledek ovlivněn přítomnými rostlinnými polysacharidy a fenolickými látkami, a případně i malou koncentrací viru ve vzorku. U molekulárních metod jako je PCR, popř. RT-PCR, je limitujícím faktorem množství použitých primerů (Nicolaisen, 2011; Hadidi et al., 2004). Multiplexní PCR, která umožňuje pomocí několika různých párů primerů amplifikovat více templátů v jedné reakci, byla vyvinuta především kvůli snížení nákladů, ke zvýšení kapacit a k úspoře času během detekce. V oblasti detekce infekčních chorob je metoda multiplexní PCR používaná při detekci virů, bakterií, hub a parazitů (Elnifro et al., 2000). Přestože má multiplex PCR značné výhody pro laboratorní použití, její optimalizace je náročným procesem. Prvním z důležitých faktorů je použití takových dvojic primerů, které budou splňovat dvě základní podmínky - nebudou mít k sobě navzájem homologní úseky a budou mít podobnou teplotu tání. Důležitá je i jejich vysoká senzitivita a specifita k templátu. Hlavním problémem je preferenční amplifikace některých úseků, nebo vznik primerových dimerů. Z tohoto důvodu je jedním z cílů optimalizace multiplex PCR, aby docházelo k co nejnižšímu množství těchto interakcí (Henegariu et al., 1997; Polz & Cavanaugh, 1998; Brownie et al., 1997). Dále je nutné optimalizovat v reakci koncentraci PCR pufru, nukleotidů, a enzymu (Elnifro et al., 2000).

Mikročipy umožňují současné detekování více možných druhů virů, viroidů, či fytoplazem, v závislosti na tom, jaké kotvy jsou na daném mikročipu použity. Jejich výhodou je i to, že je možné k hybridizaci použít vzorek připravený multiplexní PCR, ve kterém může být přítomno až několik různých produktů z multiplexní PCR shodné délky, získaných odlišnými primery. Takto získané produkty o stejné délce, budou při klasickém oddělování na agarózovém gelu tvořit jeden proužek o dané délce, ale nebude možné rozpoznat, o které patogeny se jedná.

Technika mikročipů je přínosná pro řadu molekulárních metod, ve chvílích, kdy je nezbytné sledovat více genů najednou. Proto se mikročipy využívají při zkoumání genů podílejících se na vývojových, fyziologických a patologických procesech, při objasňování genové regulace a diagnostikách (Murphy, 2002). Jsou vhodné i k odhalování jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) - například za účelem jejich mapování a spojitosti s nemocemi nebo různými fenotypy.

Firma Affymetrix vyrábí „tiling“ mikročip, který obsahuje kotvy pro celý lidský genom (Ruau & Zenke, 2008). „Tiling“ mikročipy se nyní využívají i při chromatinové precipitaci (ChIP) k zjištění polohy transkripčních faktorů a dalších molekul vázajících se na molekulu DNA, nebo k identifikaci epigenetických metylačních procesů DNA (Mockler & Ecker, 2005).

Mikročipy mají tedy své využití nejen v rostlinné virologii, ale hlavně v klinické praxi, při výzkumu rakoviny, ve farmakogenomice (Debouck & Goodfellow, 1999), toxikogenomice (Waring et al., 2001), při testování lidských a zvířecích virových i bakteriálních onemocnění, během testování bezpečnosti potravin, ale také u forenzní genetiky a určování genetické identity (Heller, 2002).

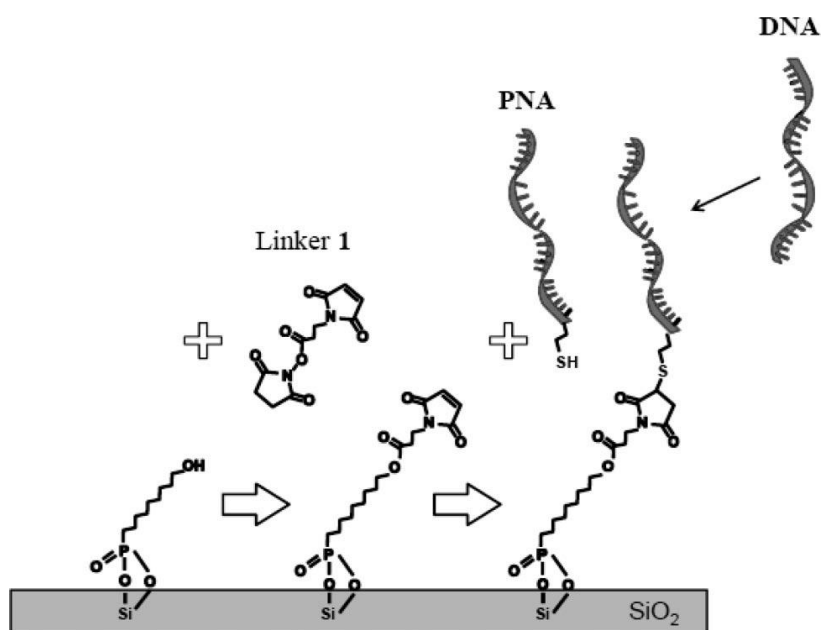
Nejčastějšími používanými podklady pro mikročipy jsou sklo a nylonová membrána. Mezi výhody skla patří především jeho dostupnost, nízká hladina fluorescence, dobrá tepelná vodivost, neporéznost a vysoká transparentnost (Bowtell & Sambrook, 2003; Cheung et al., 1999). Nylonové membrány se používají při použití citlivějšího radioaktivního značení a dají se použít opakovaně, 4 - 5 krát (Murphy, 2002).

Podklad je možné používat bez dalších úprav, nebo je na něj nanášen v tenké vrstvě substrát, který umožňuje lepší kovalentní vazbu kotev na podklad. Mezi nejčastěji používané substráty patří poly-L-lysin, aminosilan a aldehyd (Bowtell & Sambrook, 2003). Následně jsou na podklad, popřípadě podklad se substrátem, přichyceny jednotlivé navržené oligonukleotidové úseky, které budou používány jako kotvy při hybridizaci. K přichycení se používá mechanické pokovování (mechanical deposition), tištění pomocí oligonukleotidového syntetizéru (Hughes et al., 2001), nebo syntetizování *in situ* (Pease et al., 1994).

Podle použitých kotev lze mikročipy rozdělit na 3 základní typy:

- cDNA mikročipy,
- oligonukleotidové mikročipy,
- PNA mikročipy (Obr. 8).

cDNA mikročipy obsahují klonované úseky genů, větší PCR produkty, které musí být před přichycením na mikročip, denaturovány. Oligonukleotidové mikročipy jsou tvořené kratšími kotvami o délce 40 - 70 nukleotidů na základě sekvencí z databází, sekvence získané sekvenováním (Gershon, 2002), kotvy mohou být syntetizovány buď *in situ* přímo na mikročipu nebo mohou být připraveny zvlášť a poté jsou připevněny na mikročip. PNA kotvy (peptidové nukleové kyseliny) jsou umělými analogy DNA, kde jsou deoxyribóza a fosfátové skupiny nahrazeny peptidem (Egholm et al., 1993; Arlinghaus et al., 2004). PNA mikročipy mají vyšší specificitu, pokud je mezi kotvou a hybridizovanou sekvencí i jen jediný rozdíl v jediné bázi, pak k hybridizaci nedochází.



Obr. 8: Zobrazení principu PNA mikročipů. PNA molekuly jsou přichyceny na podklad z oxidu křemičitého přes 11- hydroxy-undecyl-fosfonát a linker (3-maleimidopropionic-acid-*N*-hydroxysuccinimid).

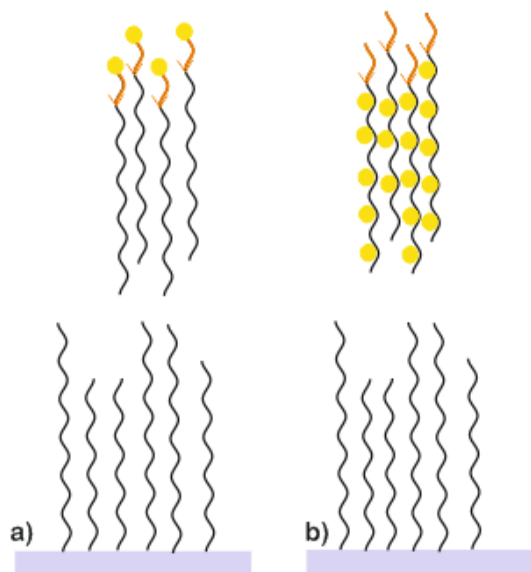
Na takto připravené kotvy se následně hybridizuje vzorek DNA (převzato z Cattani-Sholz et al., 2008).

Kotvy jsou na mikročipu umístěny na poli v pravoúhlé mřížce. V každém poli této mřížky jsou umístěny kotvy obvykle v několika svých kopiích (Obr. 7 a). Na běžných mikročipech se počet kotev na podkladu pohybuje od několika desítek po desítky tisíc podle typu mikročipu. U mikročipů využívající *in situ* syntézu oligonukleotidových kotev, například u NimbleGenů či Affymetrixu, se toto číslo pohybuje v řádu několika miliónů (McLoughlin, 2011).

U obou výše zmíněných typů mikročipů jsou kotvy mikročipu připravovány syntetizovány *in situ*. NimbleGen využívá fotokatalytickou syntézu oligonukleotidů, k tomu je využíván systém skleněných minizrcátek, která svým nastavením odrážejí paprsky a řídí připojení každého nukleotidu (McLoughlin, 2011). Kotvy mikročipů Affymetrix jsou vyráběny fotolitograficky přímo na podklad (Ruau & Zenke, 2008). Firma Affymetrix vyrábí několik druhů mikročipů, většina z nich se používá pro detekci lidských onemocnění. Jedním z jejich mikročipů je Respiratory Pathogen Microarray (RPM), který je používán k detekci virů a bakterií způsobujícím respirační onemocnění – viry chřipky, adenoviry, coronaviry, rhinoviry a z bakterií například *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis* a *Streptococcus pneumoniae* (Lin et al., 2006). Na stejném principu funguje i další mikročip, RPM-TEI od této firmy, který umožňuje detekovat tropické a rozvíjející se infekce. Kotvy tohoto mikročipu jsou cílené na velké množství známých toxických genů z různých patogenů (Leski et al., 2009; McLoughlin, 2011).

K vyhodnocení mikročipu je nutné, aby byla hybridizující nukleová kyselina fluorescenčně či radioaktivně značena. Značení DNA se provádí buď přímou, nebo nepřímou metodou. Přímá metoda spočívá v použití fluorescenčně značených primerů (Obr. 9 a), nebo v začleňování (inkorporaci) fluorescenčně označených nukleotidů (dNTPs) během syntézy DNA (Obr. 9 b). Nepřímá metoda využívá reakce mezi aminoallylovými nukleotidy s N-hydroxysuccinimidovým fluorescenčním barvivem (Gibriel, 2012).

Celý postup spočívá v přípravě značených sekvencí ze vzorků, které jsou po denuraci hybridizovány několik minut až hodin na mikročip (Obr. 7 b). Po vymytí nenavázané DNA (Obr. 7 c) a vysušení se mikročip skenuje pomocí fluorescenčního skeneru nebo vyhodnocuje hmotnostní spektrometrií (Heller, 2002). Místa s vysokou mírou fluorescence, nebo radioaktivity, odpovídají místům, kde došlo k hybridizaci - tedy poloze kotev, které jsou komplementární k DNA ve vzorku (McLoughlin, 2011).



Obr. 9: Porovnání značení hybridizovaných sekvencí. A) značení primerem.

B) značení inkorporací značených nukleotidů během syntézy DNA

(oranžová šipka značí primer, žlutá kolečka označují polohu molekul fluorescenční barvy Cy3).

Při používání mikročipů je nutné mít na zřeteli několik faktorů, které mohou ovlivnit získání kvalitních a věrohodných dat. Při výrobě mikročipů může docházet k nepřesnostem v tištění cDNA, oligonukleotidů, či PNA kotev na mikročip, vzniku velkých bodů při nadbytečném množství DNA během tištění, ke vzniku rozdílně velkých bodů mikročipu, nebo k poškození substrátu.

Kvalita výsledků je ovlivňována i během hybridizace vzorků na mikročip. Mezi nejčastější defekty patří: vznik prázdných kruhů místo plných bodů, které jsou způsobené nerovnoměrnou distribucí hybridizované DNA na bodu; kontaminace částicemi jako je prach a vlákna, přítomnost bublin během hybridizace, které zabrání získání signálu z místa, na kterém se vyskytují. Výsledný obraz získaný na skeneru je také ovlivněn nerovnoměrným sušením, blednutím fluorescence ve směru ke krajům mikročipu, vysokým šumem na pozadí způsobeným fluorescencí, nebo vznikem „černých děr“ - tento problém vzniká ve chvíli, kdy je intenzita fluorescence daného bodu rovna okolnímu pozadí (Murphy, 2002; Bowtell & Sambrook, 2003).

Dalším problematickým okruhem je samotné fluorescenční značení. Cy3 se vyznačuje celkově nízkou citlivostí při přímém značení (Nicolaisen, 2011). Opačný problém se objevuje při značení malými aminoallyl nukleotidy, kterých může být v jedné molekule DNA tolik, až dochází k „samo-zhášecímu“ efektu. Tento efekt je způsobený tím, že fluorescenční barvy zároveň i pohlcují emitované světlo. Proto molekula DNA s velkým množstvím molekul fluorescenční barvy může poskytovat méně intenzivní signál než molekula značená jen jednou molekulou fluorescenční barvy v pozici na 5' konci primeru (Cox et al., 2004).

Výsledky hybridizace jsou také ovlivněny způsobem izolace vzorku, kvalitou jeho zpracováním i množstvím. V případě smíšených infekcí neznáme poměr obsažených nukleových kyselin ani jejich jednotlivé množství. To pak může mít za následek nejednotný signál z hybridizovaných sekvencí (Šíp et al., 2010).

2. Cíle práce

1. RT - PCR detekce virů z ovocných dřevin (ApMV, PNRSV, PPV, PDV), ověření infekcí sekvenováním produktů.
2. Návrh primerů a optimalizace RT – PCR pro přípravu značených amplikonů v 1 kroku pro použití u mikročipů.
3. Detekce amplikonů na mikročipu.
4. Analýza získaných fragmentů a návrh nových lepších, univerzálněji použitelných kotev.

3. Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Jako materiál byly používány čerstvé nebo lyofilizované vzorky listů z ovocných stromů pocházejících z Čech – hrušek, švestek, třešní, broskví a stélky lišejníku *Usnea antarctica* (L6B) (Petřík et al., 2013).

3.2 Izolace RNA

K izolaci RNA z jednotlivých vzorků byly použity dvě metody: izolace celkové RNA a izolace virové dsRNA.

3.2.1 Izolace RNA

K izolaci celkové RNA (RNA) z výše uvedených vzorků byly používány dodávané soupravy – Nucleospin Plant II (Macherey - Nagel, Německo) nebo RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nizozemí) přesně podle příloženého návodu.

3.2.2 Izolace dsRNA

DsRNA (dvouřetězcová RNA) vzniká během replikace pozitivních a negativních jednořetězcových RNA virů jako replikační intermediát. DsRNA má vyšší termodynamickou stabilitu a odolnost vůči degradaci RNázami (Tzanetakis & Martin, 2008). Izolace dsRNA ze vzorků byla prováděna modifikovanou metodou podle (Valverde et al., 1990).

K 100 mg homogenizovaného vzorku bylo přidáno 1 000 μ l 2x STE. Po převedení do mikrokumavek bylo přidáno 600 μ l fenolu, 400 μ l chloroformu a 100 μ l 10% SDS.

Následně byl vzorek umístěn na rotátor BioRS – 24 (Biosan, Litva) po dobu 30 minut při 30 rpm ve 4°C. Vzorek byl centrifugován ve vychlazené centrifuze Micro200R (Hettich Zentrifugen, Německo) 15 000 rpm po dobu 15 minut. Supernatant byl převeden do nové zkumavky s 0,1 g vláknité celulózy a 160 µl 100% etanolu. Vzorek byl opět umístěn na rotátor po dobu 30 minut za stejných podmínek - centrifugován 15 000 rpm, 15 minut při 4°C. Následně byl vzorek opět centrifugován 15 000 rpm 2 minuty, přidat 1% STE a etanol do výsledné koncentrace 16%, tento krok byl 5 krát opakován. Poté byl vzorek vysušován v přístroji CentriVap Cold Trap (Labcont, Kansas, USA) po dobu 20 minut. Po vysušení byl vzorek rozpuštěn v 500 µl 1x STE a umístěn opět na rotátor na 30 minut, centrifugován 15 000 rpm po dobu 2 minut. Supernatant byl odebrán do nové mikrozkušavky, kam byl přidán 1 µl glykogenu a 2 objemová množství 100% etanolu. Vzorek byl ponechán v mrazicím boxu při -20°C přes noc. Druhý den byl vzorek centrifugován při 4°C 15000 rpm po dobu 15 minut. Vodní fáze byla odstraněna, vzorek byl sušen 4 minuty v přístroji CentriVap a následně rozpuštěn ve 40 µl vody. Poté byl vzorek rovnou použit pro další analýzy či byl uskladněn v mrazicím boxu při -20°C.

3.3 Primery

V této práci bylo používáno 5 různých párů primerů (Tab. I), čtyři virově specifické páry primerů pro detekci jednotlivých virů – ApMV, PPV, PDV, PNRSV, a jeden pár univerzálních primerů. Specifické primery byly převzaty (Lenz et al., 2008) a poté i nově navrženy (programem Primer - Blast) podle sekvencí získaných z databáze GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), kromě specifické části pro určitý virus primery obsahovaly ještě univerzální část (F: 5'-GTACGCCGGAGCTAG, R: 5'- GTTACGAGCGC GTGA) (Lenz et al., 2013, nepublikované údaje). Připojená univerzální část s virovými sekvencemi nehybridizuje, má své využití jen v reamplifikačních reakcích. Při nich dochází k současnému fluorescenčnímu označení barvou Cy3 všech molekul DNA, které byly namnoženy specifickými primery s univerzální částí. V naší práci toto značení probíhalo pouze reverzním primerem. Celý postup je znázorněn na následujícím obrázku (Obr. 10).

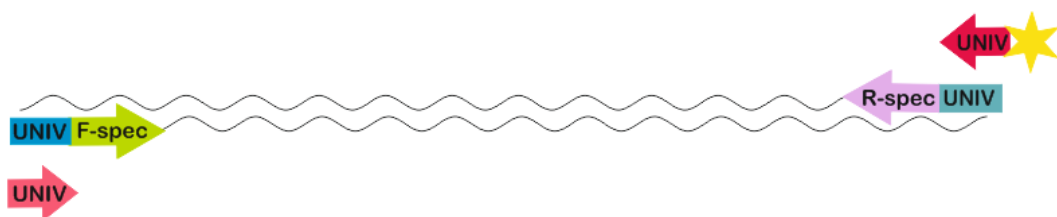
1) Reverzní transkripce



2) PCR reakce se specifickými primery obsahující univerzální část



3) Reamplifikace univerzálními primery a současné fluorescenční značení Cy3



Obr. 10: Zobrazení návrhu na ideální postup.

Tab. I. Primery navržené pro detekci ApMV, PDV, PNRSV, PPV a univerzální primery používané pro reamplifikaci.

Virus	Primery	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost amplikonu (bp)
ApMV	ApMV- F	GAAAATTCCGAGAGGTCACA	320
	ApMV - R	CCAACCTAAACTTCCTCACG	
PDV	PDV – F	CGATTGGTTAACTCACTTTG	288
	PDV - R	GTACGAGATATCATACCGG	
PNRSV	PNRSV – F	CCTCCCCGAATTCCTAAGGG	349
	PNRSV - R	GCACTTCGGTCTTGAATT	
PPV	PPV – F	GCTTTGCTAGTGATACATTGG	306
	PPV - R	GTGAACTTTGGCTGCAAGTG	
Univerzální	U - FWD	GTACGCCGGAGCTAG	-
	U - Rev	GTTACGAGCGCGTGA	

3.4 Reverzní transkripce

Po izolaci RNA z jednotlivých vzorků byla cDNA připravována reverzní transkripcí (RT), iScript cDNA Synthesis Kitem (Bio-Rad, Kalifornie, USA) s použitím náhodných hexanukleotidových primerů. Tento postup má tu výhodu, že dochází k přepisu veškeré RNA ve vzorku. Po namíchání níže uvedené směsi probíhala reakce podle schématu v tabulce (Tab. II) na přístroji ESCO Swift Maxi (ESCO, Oregon, USA).

5x iScript reakční směs	2 µl
iScript reverzní transkriptáza	0,5 µl
vzorek obsahující ssRNA	7,5 µl
	10 µl

Tab. II: Programové schéma pro RT pomocí „iScript cDNA Synthesis Kit“.

RT	
Teplota [°C]	Čas [min]
25	5
42	50
85	5
4	∞

Takto získaná cDNA vzorků byla pro další testování uložena v chladničce.

3.5 PCR reakce

Pro amplifikaci jednotlivých úseků virů byly používány navržené virově specifické primery (Tab. I). Programová schémata pro PCR jednotlivých virů jsou uvedena v příloze 9.2. Na PCR reakce byla používána komerčně dodávaná směs PPP Master Mix (Top-Bio, ČR) podle následujícího rozpisu:

2x PPP Master Mix	10 µl
Forvard primer	0,3 µl
Reverse primer	0,3 µl
cDNA vzorku	0,5 µl
Rnase-free H ₂ O	8,9 µl
	20 µl

K reamplifikaci vzorků byly používány univerzální primery s připojenou fluorescenční molekulou Cy3. Ta je nezbytná pro detekci na fluorescenčním skeneru. Při reamplifikaci byly používány vzorky po první PCR, 200x naředěné sterilizovanou destilovanou vodou. Po reamplifikaci byly amplifikované produkty přečištěny pomocí dodávané soupravy NucleoSpin Extract II (Macherey - Nagel, Německo). Postup byl prováděn přesně podle návodu výrobce.

3.6 Elektroforéza DNA na agarovém gelu

PCR produkty byly analyzovány elektroforézou v 1 - 2% agarozovém gelu připraveném v 0,5x TBE pufru. Před nanášením byly vzorky smíchány s nanášecím pufrům obsahujícím SYBRGreen barvivo. Pro určování velikostí jednotlivých fragmentů byl na každý gel nanášen i velikostní standard DNA FastRuler™ Middle Range DNA Ladder (ThermoScientific, USA), nebo FastRuler™ High Range DNA Ladder (ThermoScientific, USA) v závislosti na velikosti očekávaného fragmentu. Vyhodnocování gelů probíhalo na UV transilluminatoru.

3.7 Sekvenování

Produkty, získané PCR reakcemi, byly po přečištění komerční soupravou NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey - Nagel, Německo), sekvenovány. Přečišťování bylo prováděno přesně podle návodu výrobce. Pro sekvenování byly používány vždy reverzní specifické primery s připojenou univerzální částí. Sekvenační reakce byla prováděna metodou odvozenou ze Sangerovy metody (Sanger et al., 1977) na sekvenátoru ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) kitem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

3.8 Hybridizace na mikročip

V této práci byly používány mikročipy (Greiner Bio One, Freistadt, Rakousko), které byly navrženy v naší laboratoři Mgr. O. Lenzem, PhD. (Lenz et al., 2008). Tyto mikročipy jsou v laboratoři rostlinné virologie používány jak pro detekci některých (+) ssRNA virů ovocných stromů, tak i pro detekci jednotlivých skupin fytoplazem. Rozložení a sekvence jednotlivých kotev pro viry používané v této práci jsou uvedené v příloze 9. 3 a 9.4.

V mikroskopu bylo smícháno 15 μ l hybridizačního pufru (500 μ l formamid, 500 μ l 20x SSC, 20 μ l 10% SDS) zahřátého na přibližně 42°C a 15 μ l přečištěného testovaného vzorku. Směs byla denaturována při 95°C po dobu 3 minut. Následně bylo 30 μ l vzorku nanášeno na pole mikročipu. Hybridizace probíhala při 42°C minimálně po dobu 45 minut, ale častěji přes noc. Následně byl mikročip promýván v 50 ml zahřátých, tj. o teplotě přibližně 42°C, promývacích pufrech o různé koncentraci SSC uvedené v následujícím schématu, upravenou metodou dle (Nicolaisen, 2011):

2x SSC, 0,1% SDS	1 minuta
1x SSC	1 minuta
0,1 SSC	5 minut

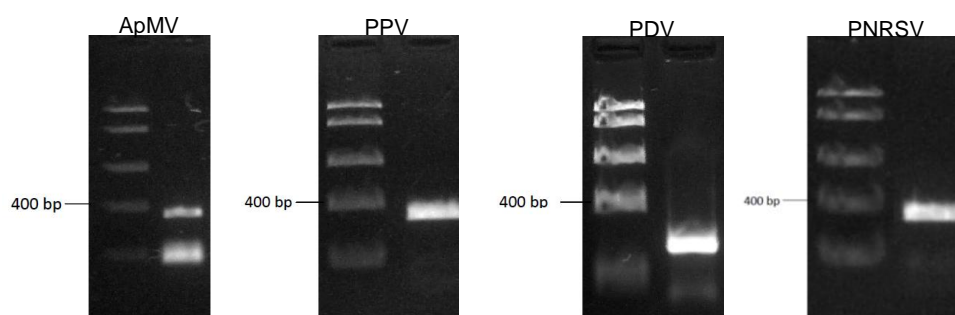
Po promytí byl mikročip volně sušen dnem vzhůru v zatmavených zkumavkách typu Falcon. Celý postup hybridizace byl prováděn za minimálního přístupu světla, abychom předešli nechtěnému snížení fluorescence.

4. Výsledky

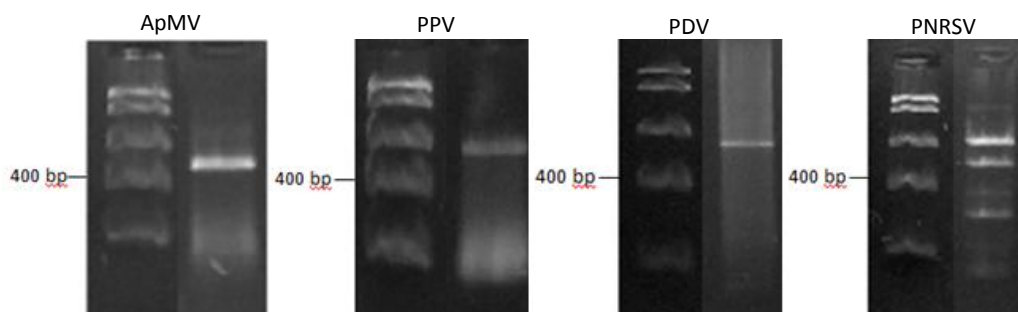
4.1 RT-PCR detekce virů ovocných stromů ApMV, PDV, PPV, PNRSV

Naším cílem bylo současně detekovat 4 vybrané viry ve dvou reakcích a otestovat možnost přípravy vzorků v jedné reakci (Obr. 10).

Navržené virově specifické primery (Tab. I, příloha 9.1) umožňují amplifikaci kratších úseků virů (Obr. 11), které převážně obsahují jen oblasti komplementární ke kotvám na mikročipu. Získané produkty byly ověřené sekvenováním. Pro porovnání je uveden obrázek s použitými převzatými primery (Obr. 12) (Lenz et al., 2008). Pro reverzní transkripci vzorků byly používány náhodné hexanukleotidové primery, konkrétně iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Kalifornie, USA).

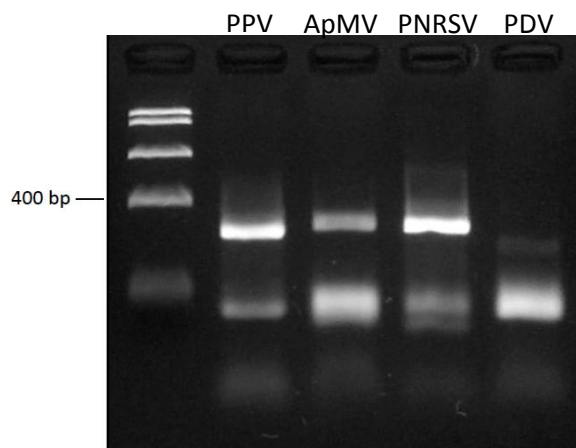


Obr. 11: Výsledky PCR reakcí se specifickými univerzálními primery pro jednotlivé viry, v pořadí ApMV, PPV, PDV, PNRSV.



Obr. 12: Výsledky PCR reakcí s převzatými specifickými primery (Lenz et al., 2008) pro jednotlivé viry: ApMV, PPV, PDV, PNRSV.

Po optimalizaci reakčních podmínek PCR reakce pro jednotlivé viry a jejich reamplifikaci univerzálními značenými primery (Obr. 13) a otestování na mikročipech, jsme se pokoušeli o detekci více virů najednou. Jednotlivé PCR programy, které byly používány, jsou uvedeny v příloze (příloha 9. 2).



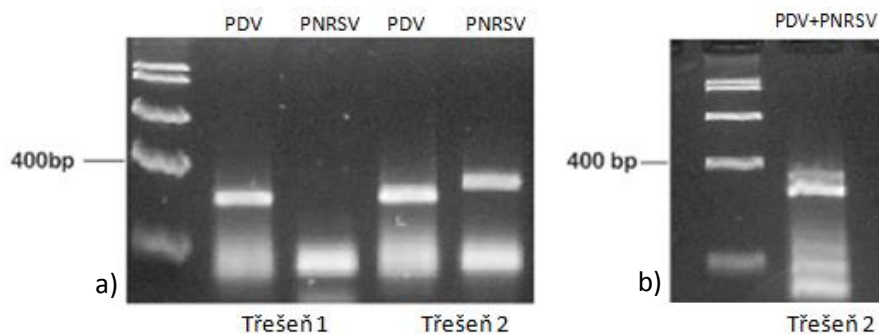
Obr. 13: Reamplifikace univerzálními primery.

V pořadí velikostní standard, PPV, ApMV, PNRSV a PDV.

Po reamplifikaci byly vzorky přečistěny pomocí komerční soupravy NucleoSpin Extract II (Macherey - Nagel, Německo) a byla provedena hybridizace na mikročip. Vzhledem k tomu, že bylo používáno fluorescenční značení, jsme se snažili provádět všechny úkony, od počátku reamplifikace, za co nejnižšího dopadu světla, aby nedocházelo ke snižování námi potřebné fluorescence.

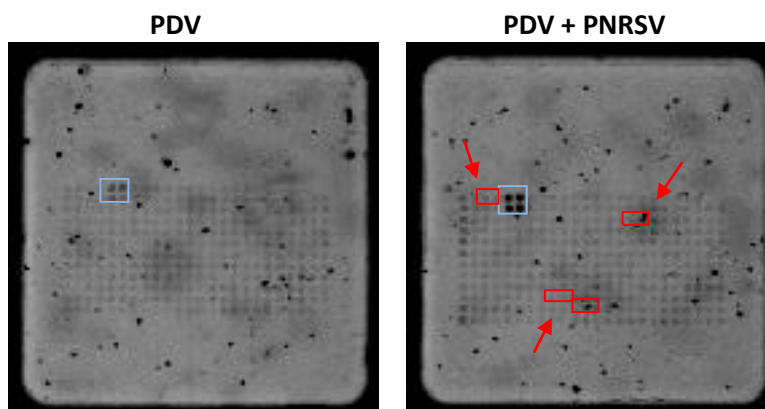
Nejvyšší počet virů, které bylo možné detekovat v jedné reakci společně s následnou reamplifikací, byly dva. Ani v případě smíchání více cDNA, obsahující různé viry, jsme nebyli úspěšní. V tomto případě docházelo k amplifikaci pouze jednoho viru.

Specifický případ nastal u vzorku třešně, který obsahoval viry PDV a PNRSV. Po izolaci virové dsRNA ze vzorků, byly vzorky otestovány na přítomnost virů vyskytujících se převážně u třešní – PDV a PNRSV. Vzorek na následujícím obrázku (Obr. 14a) označený jako třešeň 2, byl pozitivní pro oba viry, proto jsme zkusili multiplexní PCR pro oba viry, její výsledek je vidět na obrázku (Obr. 14b).



Obr. 14: V levé části je výsledek první PCR reakce dvou vzorků z třešní na dva viry – PDV, PNRSV, v pravé části je zobrazena multiplexní PCR pro dva viry ze vzorku třešeň 2 – PDV, PNRSV.

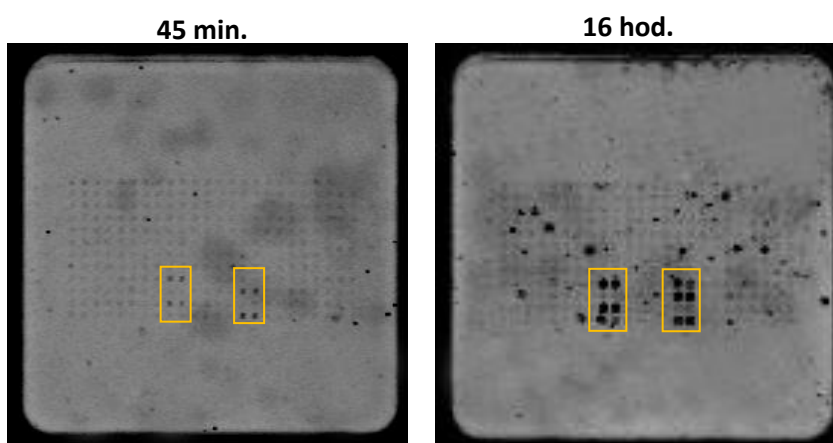
Po reamplifikaci s univerzálními značenými primery byla provedena hybridizace vzorků, jak každý virus zvlášť, tak i směs dvou virů. Vzorky, které byly připraveny pro jeden virus hybridizovaly normálně, vzorek obsahující dva viry připravované od počátku multiplexní PCR reakcí vykazoval anomálii. Při hybridizaci měl vyšší fluorescenci virus PDV, při stejné době hybridizace, než v případě kdy byl hybridizován samostatně, a virus PNRSV vůbec nehybridizoval (Obr. 15). Během hybridizace pravděpodobně došlo ke křížové hybridizaci, která se u příbuzných virů může vyskytnout (Nicolaisen, 2011).



Obr. 15: Zobrazení hybridizace PDV a kombinace PDV + PNRSV ze vzorku třešeň 2, místa pro hybridizaci PNRSV jsou červeně zvýrazněna.

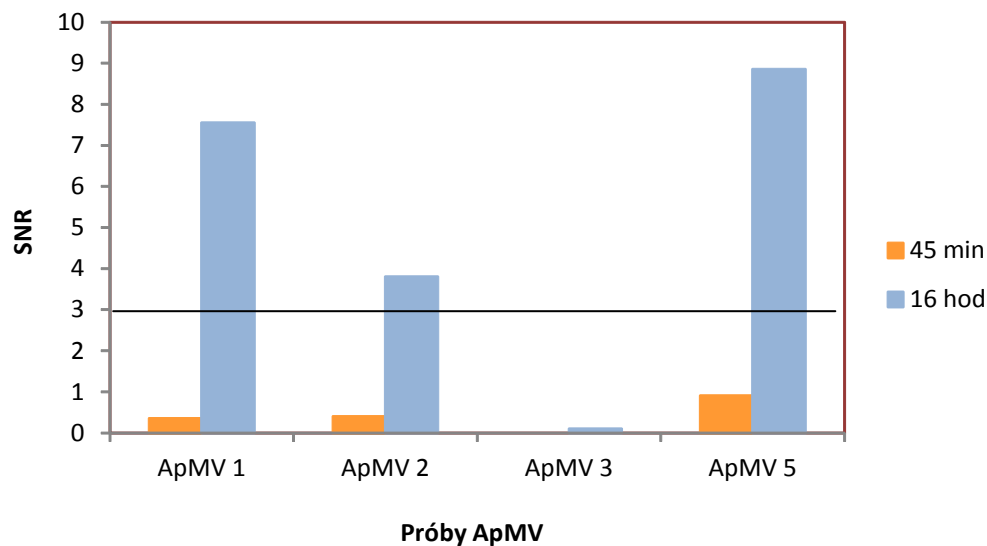
4. 2 Detekce ampliconů na mikročipu

K hybridizaci byla používána denaturovaná směs 15 μ l extrahovaného vzorku a 15 μ l přehřátého hybridizačního pufru (složení je uvedeno v kapitole 3.8). Hybridizace byla prováděna nejprve po dobu 45 minut při 42°C (Lenz, 2011), ale vzhledem k nízké fluorescenci byla hybridizace prodloužena a prováděna ji přes noc (Šíp et al., 2010; Grover et al., 2010). Prodloužením doby hybridizace se zvýšila intenzita fluorescence (Obr. 16).



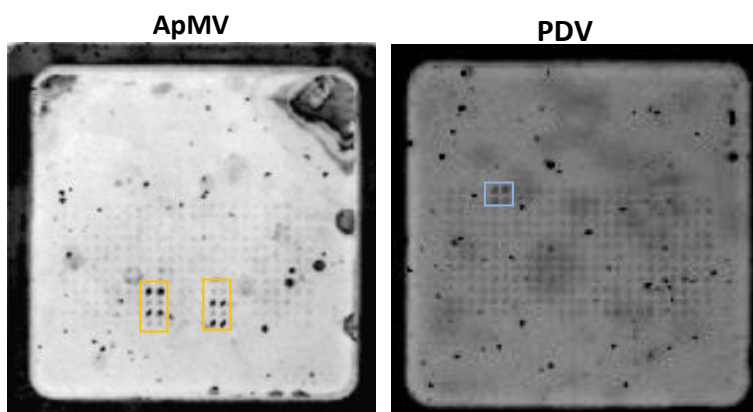
Obr. 16: Vliv délky hybridizace ApMV na intenzitu fluorescence.

K analýze mikročipu je používán počítačový program ImageQuant TL v 2003.02 (Amersham Biosciences, USA), který umožňuje změření fluorescence vzhledem k pozadí. Signál byl považován za pozitivní v případě, že jeho hodnota vzhledem k pozadí (signal-to-noise ratio, SNR) byla větší než 3. Hodnota SNR byla vypočtena jako čistý signál (odečten signál šumu) z dané kotvy dělený standardní odchylkou (standard deviation, SD) signálu ze všech kotev. Tedy $SNR = \text{čistý signál} / SD$. Na dalším obrázku (Obr. 17) je porovnání dvou vyhodnocení hybridizací vzorku ApMV s různou délkou doby hybridizace – 45 minut a 16 hodin. V tomto případě je již fluorescence snížena opakovaným skenováním obrázku, při opakovaném použití mikročipu, přesto je signál ze vzorku hybridizovaného 16 hodin 12,3 krát silnější než ze vzorku hybridizovaného 45 minut. Jak vypadaly obě hybridizace po prvním skenování, je zobrazeno na předchozím obrázku (Obr. 16).



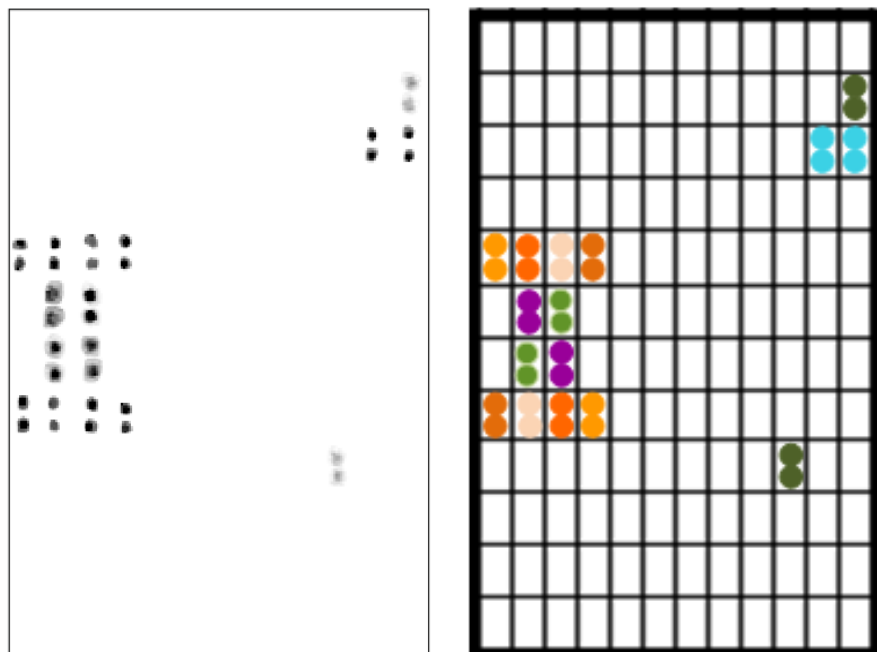
Obr. 17: Vliv délky hybridizace ApMV na intenzitu fluorescence – porovnání hodnot SNR.

Dále jsme zkoumali, zda je nějaký rozdíl mezi hybridizacemi vzorků získaných z celkové ssRNA a virové dsRNA. Ale nebyl zaznamenán žádný rozdíl, SNR pro dsRNA se pohybovali ve stejném rozmezí jako u ssRNA (Obr. 18).



Obr. 18: Hybridizace ApMV získaného z izolace celkové ssRNA vzorku a PDV získaného izolací dsRNA ze vzorku. Hybridizace probíhala 45 minut.

Promývání mikročipu po hybridizaci probíhalo přesně podle návodu (složení roztoků a doba promývání je uvedena v kapitole 3.8.). Po řádném osušení na vzduchu byly mikročipy skenovány na skeneru Typhoon 9410 (Amersham Biosciences, UK) programem Typhoon Scanner Control v. 4.0. Na následujícím obrázku (Obr. 19) je kompletní zobrazení výsledku hybridizací, společně se znázorněním hybridizujících kotev virů.



Obr. 19: Zobrazení výsledků hybridizací na mikročipu a poziční zobrazení pro jednotlivé viry (PPV – fialové, PDV – modré, PNRSV – zelené, ApMV – oranžové; pokud virus hybridizuje na více kotev, jsou od sebe odlišeny odstíny dané barvy). Neoznačené (prázdné) pozice obsahovaly kotvy k jiným, než virovým patogenům nebo k virům, které nebyly používány v této práci.

4.3 Specifita mikročipu a návrh nových kotev

Jako první vyhodnocení, které bylo provedeno, je porovnání získaných sekvencí s jednotlivými kotvami pro každý virus. Podobnost získané sekvence ApMV s jednotlivými kotvami: ApMV 1 – 82,5 %, ApMV 2 – 97,5%, ApMV 3 – 87,5%, ApMV 5 – 100%. Podobnost sekvence PDV s kotvou PDV 5 je 92, 5%. Kotva PNRSV 1 byla 100% komplementární k naší sekvenci, kotva PNRSV 6 byla komplementární z 97,5%. Kotva PDV 5 je ze 42,5% komplementární k sekvenci PNRSV.

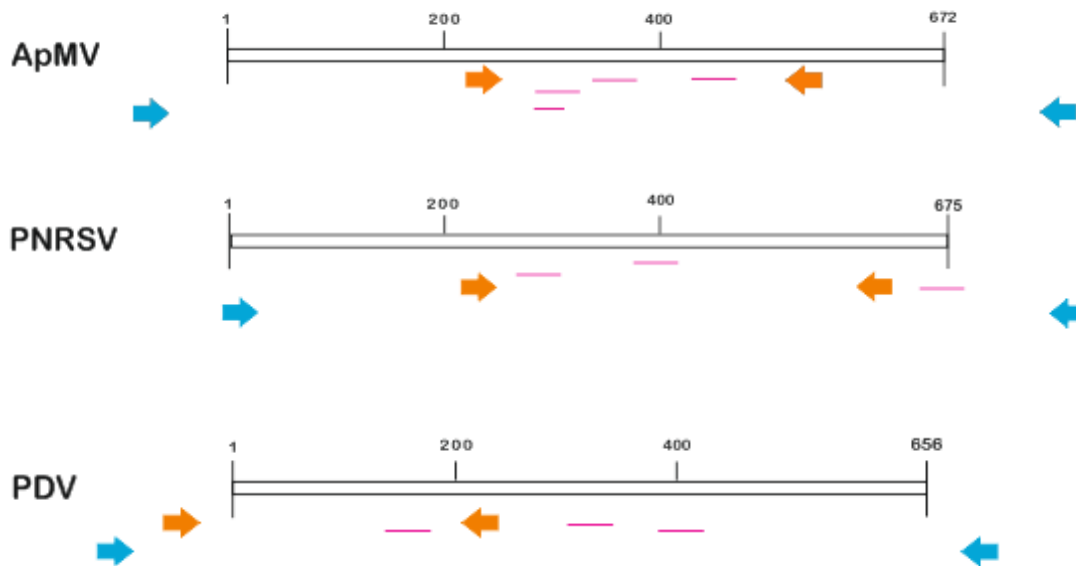
Cílem návrhu nových kotev bylo vytvoření univerzálnějších kotev, které by se daly použít pro další mikročip. Z tohoto důvodu jsem porovnávala sekvence z databáze GeneBank a svou sekvenci, a snažila jsem se najít univerzálnější místo na CP virů pro kotvy. U viru PNRSV by bylo vhodné nalézt ještě jednu kotvu, která by nahradila původní kotvu PNRSV 5, která se při použití mých primerů nachází v pozici, kdy nedochází k amplifikaci její komplementární části. Proto by byla vhodná jiná kotva v oblasti mezi kotvou PNRSV 1 a PNRSV 6, která by ji nahradila. Například by se dala použít kotva v konzervativní oblasti 5'-GGTTCTTGAAGGACCAACCGAGAGGTTGGCAGTTCGAACCT. Ke zvýšení komplementarity kotvy PNRSV 6 bych navrhovala posunout sekvenci o 5 bází směrem k 3' konci na sekvenci 5'-TCACCGAGAGGTGACGACGACAGAGGCAGTGAAGTACTTG z toho důvodu, že by sekvence byla plně komplementární se všemi sekvencemi v provedeném aligmentu (ClustalX 2.1) a nedocházelo by k odchýlkám.

U viru ApMV by bylo vhodné navrhnout jinou kotvu místo jedné ze dvou kotev číslo 3, nebo 5, protože obě nasedají na shodnou oblast genomu, a nahradit ji kotvou pro oblast 5'-GACCAACCGAGAGGTTGGCAGTGGGAAGCCCCTCCAAACAC či 5'-ATGGATG GATTGGGTTAGTGGAGGATTACGATGAGAGTA, které jsou dle provedeného aligmentu více komplementární než kotva ApMV 3.

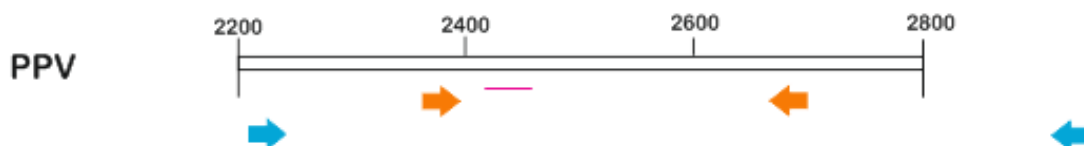
Ke snížení možnosti křížové hybridizace PNRSV a PDV bych navrhovala například kotvu posunout či přidat kotvu blíže k F-primeru na sekvenci 5'-TGGAAAGCCTACTACC CGATCACAAAGCTTTGCTTTAGCT. V tomto případě použití této sekvence jako kotvy by podobnost se sekvencí PNRSV klesla ze 42,5% na 30%.

5. Diskuze

V začátcích této práce jsem se potýkala s problémy optimalizace (RT) - PCR reakcí. Specifickými virovými primery, které jsem měla k dispozici (Lenz et al., 2008), docházelo k amplifikaci dlouhých ampliconů (800 - 900 bp) a i optimalizace PCR reakce pro jednotlivé viry se nedařila. Proto jsem začala s návrhy nových primerů, které by amplifikovaly jen část viru homologní k jejich specifickým kotvám na mikročipu. Velikost předpokládaných ampliconů po použití těchto primerů byla přibližně třetinová než v případě původních převzatých primerů (Lenz et al., 2008). Na následujících schématech jsou zobrazeny části genomů všech používaných virů s vyznačenými oběma typy používaných primerů a oblastmi pro specifické kotvy na mikročipu (Obr. 20 a 21). Abychom měli jistotu, že opravdu pracujeme s pozitivními vzorky, byly vzorky po první PCR reakci sekvenovány. Při porovnávání s databází GeneBank se naše vzorky shodovaly z 99% u virů ApMV a PNRSV, 96% s kmenem PPV-D, shoda 90% byla u viru PDV.



Obr. 20: Zobrazení míst nasedání primerů na CP viru ApMV, PNRSV (modře jsou zobrazené převzaté, oranžově navržené primery) a vyznačení míst pro nasedání kotev. K ilustraci byla použita sekvence CP vzorku L6B (GI: 542064525) pro ApMV (Petrzik et al., 2013), sekvence CP vzorku PNRSV (GI: 1575050), sekvence CP vzorku PDV (GI: 452499).



Obr. 21: Zobrazení míst nasedání primerů na část polypeptidu, Hc-Pro/P3, viru PPV (modře jsou zobrazené převzaté, oranžově navržené primery) a vyznačení míst pro nasedání kotev. K ilustraci byla použita kompletní sekvence viru (GI:316982713).

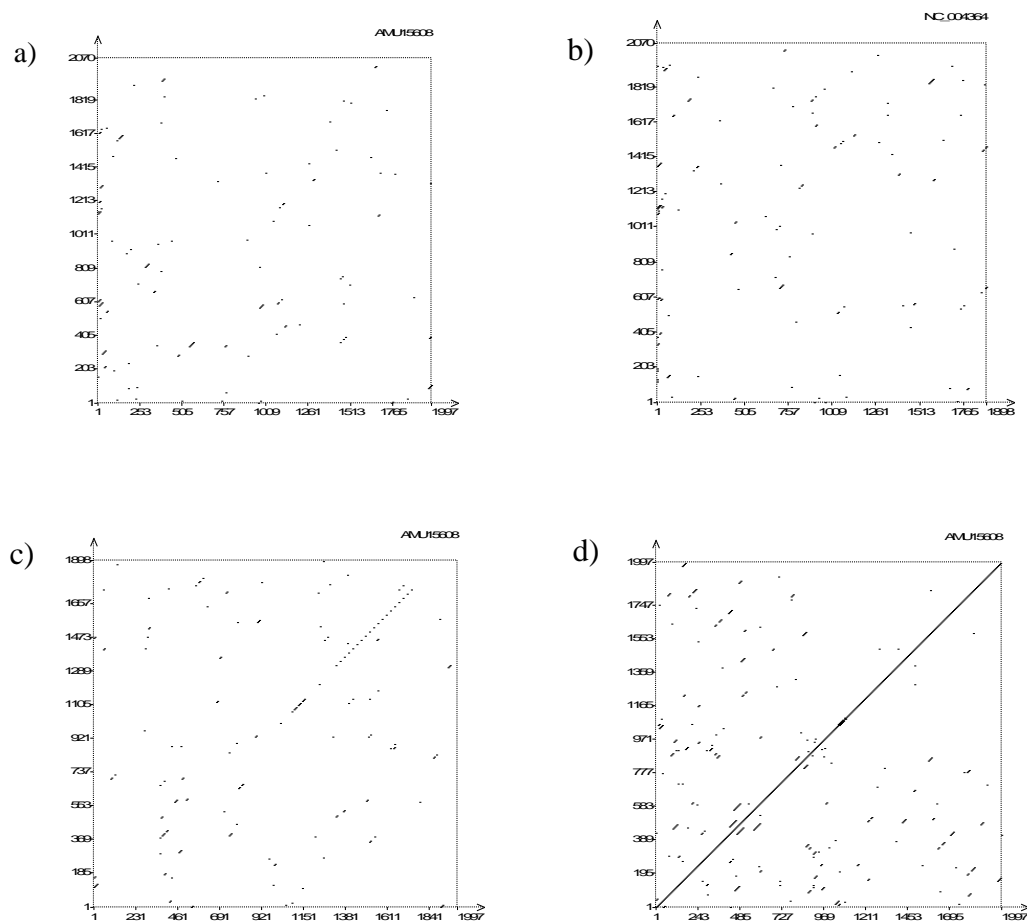
Následná reamplifikace univerzálními primery probíhala bez větších problémů. Jako templát pro reverzní transkripci byla používána izolovaná celková ssRNA a dsRNA. Výsledky ale nevykazovaly žádný rozdíl při PCR reakcích ani při hybridizaci, v závislosti na tom, zda byla ze vzorku izolována celková ssRNA či virová dsRNA.

V některých případech je k hybridizaci rovnou používána připravená cDNA, kdy je vzorek barven již během reverzní transkripce fluorescenčními barvami – Cy3 a Cy5 (Duggan et al., 1999). Amplifikace a reamplifikace PCR reakcí je naopak nezbytná pro zvýšení citlivosti metody mikročipu. To je důležité u detekce virů dřevin, kde se viry vyskytují v poměrně nízké koncentraci a nerovnoměrně (Pasquini et al., 2008; Sochor et al., 2012; Barba et al., 2011).

Ilarviry i PPV jsou navíc detekovatelné jen v úzkém časovém rozmezí (Svoboda & Polák, 2010; Matic et al., 2008; Barba et al., 2011). Jsou nestabilní a velmi lehce dochází k degradaci materiálu během izolace ds/ss RNA, je proto nezbytné pracovat s naprosto spolehlivě infikovaným materiálem. Během izolace ds/ss RNA je nutné vzorky zpracovávat rychle, bez velkých teplotních změn a s použitím roztoků o daném pH. Pokud chceme uchovávat rostlinné vzorky obsahující Ilarviry či PPV, měli bychom volit rychlé mražení na -78°C (Fulton, 1957). Pomalým mražením dochází k degradaci virů ve vzorku, je pak velmi malá pravděpodobnost, že izolace virové RNA bude úspěšná.

Pro zvýšení citlivosti mikročipu byla prodloužena doba hybridizace ze 45 minut na délku celé noci, což odpovídalo přibližně 16ti hodinové hybridizaci. Navíc byly vzorky a primery obsahující fluorescenční značení Cy3 vystavovány naprosto minimálnímu přístupu světla, například obalením mikrozkuhavek alobalem, aby byla snížena možnost vysvícení našeho fluorescenčního značení.

V případě hybridizace vzorku obsahující PNRSV a PDV se pravděpodobně projevila křížová hybridizace, kterou však není možné předpovědět porovnáním sekvencí obou virů (Obr. 22). Z porovnání nukleotidových sekvencí genomového segmentu RNA3 Iilarvirů je zřejmé, že mezi ApMV a PNRSV je velká nukleotidová podobnost, která se na grafu zobrazí jako diagonální stopa (Obr. 22 c). Při zvolených parametrech (okno 60 nt široké, stringency 45 nukleotidů) se ukazuje řada repetitivních a velmi podobných úseků i v rámci jednoho individuálního genomu (Obr. 22 d), které mohou ovlivňovat specificitu hybridizací, pokud kotvy náhodou obsahují danou sekvenci.



Obr. 22: Identita nukleotidových sekvencí RNA3 ilarvirů: a) identita PDV a PNRSV, b) PDV a ApMV, c) ApMV a PNRSV, d) ApMV a ApMV. Parametry: okno - 60 nt, stringency – 45.

Během skenování provedených hybridizací se i v mé práci vyskytovaly problémy spojené s omýváním mikročipů, kdy se objevovala kontaminace částicemi prachu a vláknů a docházelo ke vzniku bublin. Další velmi problematickou částí je tvorba tmavých map objevující se během fluorescenčního skenování, tyto mapy vznikají pravděpodobně nerovnoměrným vysušením čipu. V některých publikacích se uvádí postup používající sušení v centrifuze (Grover et al., 2010). Tento postup je ale vhodný spíše pro mikročipy, které nemají ohraničená jednotlivá pole. Již dříve byl tento postup na našich mikročipech zkoušen a ukázal se jako nevhodný, protože docházelo ke vzniku větších map v okolí ohraničení (Lenz, 2011). Omývání mikročipů má značný vliv na kvalitu získaných výsledků, je složité najít nějaký univerzální postup. Nejčastější rozdíly jsou uváděny nejen v různých koncentracích roztoků SSC, SDS a roztoků obsahujících oba, jak SSC, tak SDS, ale i v jednotlivých časech, po které je mikročip v jednom roztoku promýván (Fessehaie et al., 2002; Nicolaisen, 2011; Ideker et al., 2003; Šíp et al., 2010), a také v teplotě roztoků, která se pohybuje většinou od 42°C (Grover et al., 2010) až po 68°C (Miller et al., 2002). V některých postupech je mikročip nakonec ještě promýván ultračistou vodou (Abdullahi et al., 2011), tento krok byl na našich mikročipech vyzkoušen. Výsledek, ale nebyl o moc rozdílný a ke zmírnění problémů spojených s promýváním a sušením nedošlo.

6. Závěr

1. Z čerstvých a lyofilizovaných vzorků z ovocných dřevin a lišejníku jsme izolovali virovou RNA, kterou jsme poté komerční sadou iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Kalifornie, USA) přepsali do cDNA. Následnou PCR reakcí se specifickými virovými primery s připojenou univerzální částí jsme získali amplikony virových CP u tří virů - ApMV, PNRSV a PDV, či Hc-Pro/P3 u viru PPV. V dalším kroku jsme amplikony fluorescenčně označili druhou sadou primerů, která byla pro všechny čtyři viry stejná, obsahujícími fluorescenční značku Cy3. Produkty byly po první PCR reakci sekvenovány, pro ujištění, že pracujeme s pozitivními vzorky.

2. Jedním z prvních úkolů bylo navržení nových primerů, které by amplifikovaly menší úseky, ale zároveň takové aby obsáhly sekvence homologní ke kotvám na mikročipu, a tím umožnily jednodušší optimalizaci PCR reakce. Byly navržené nové primery, které se ukázaly být vhodnější pro detekci virů než původní převzaté primery (Lenz et al, 2008). Optimalizovat všechny čtyři páry pro multiplexní reakci se nepodařilo, podařilo se provést multiplexní PCR nejvíce pro dva viry.

3. Při provádění detekcí amplikonů na mikročipu bylo zjištěno že je lepší nechat vzorky hybridizovat přes noc, pro zvýšení intenzity fluorescence. Při detekci vzorků obsahujícího dva různé viry docházelo k hybridizaci pouze jednoho viru a při hybridizaci vzorku obsahující PDV a PNRSV pravděpodobně docházelo ke křížové hybridizaci a PDV hybridizovalo mnohem silněji než ve vzorku, kde byl jako jediný virus.

4. Návrh nových kotev byl proveden a pravděpodobně budou testovány při tisku další sady mikročipu.

7. Seznam použitých zkratek

ApMV	Apple mosaic virus - Virus mozaiky jabloně
PPV	Plum pox virus - Virus šarky švestky
PDV	Prune dwarf virus - Virus zakrslosti slivoně
PNRSV	Prunus necrotic ringspot virus - Virus nekrotické kroužkovitosti slivoně
ACLSV	Apple chlorotic leaf spot virus - Virus chlorotické skvrnitosti jabloně
ASGV	Apple stem grooving virus - Virus žlábkovitosti kmene jabloně
RNA	Ribonucleic acid - Ribonukleová kyselina
DNA	Deoxyribonucleic acid - Deoxyribonukleová kyselina
ORF	Open reading frame - Otevřený čtecí rámec
dNTPs	Deoxyribonucleotides - Deoxyribonukleotidy
SNPs	Single-nucleotide polymorphism – Jednonukleotidový polymorfismus
ChIP	Chromatin immunoprecipitation - Chromatinová imunoprecipitace
cDNA	Complementary DNA – Komplementární DNA
ssRNA	Single – stranded RNA - Jednořetězcová RNA
dsRNA	Double – stranded RNA - Dvouřetězcová RNA
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
RT	Reverse transkriptase - Reverzní transkripce
MP	Movement protein - Transportní protein viru
CP	Coat protein – Kapsidový protein

8. Citovaná literatura

- Abdullahi, I., Gryshan, Y. and Rott, M. (2011). Amplification-free detection of grapevine viruses using an oligonucleotide microarray. *Journal of Virological Methods* **178** (1-2): 1-15.
- Amari, K., Burgos, L., Palla, V. and Sánchez-Pina, M. A. (2009). Vertical transmission of Prunus necrotic ringspot virus: hitch-hiking from gametes to seedling. *Journal of General Virology* **90** (7): 1767-1774.
- Arlinghaus, H. F., Schröder, M., Feldner, J. C., Brandt, O., Hoheisel, J. D. and Lipinsky, D. (2004). Development of PNA microarrays for gene diagnostics with TOF-SIMS. *Applied Surface Science* **231–232**: 392–396.
- Atanasoff, D. (1932). Plum pox. A new virus disease. *Yearbook University of Sofia, Faculty of Agriculture and Silviculture* **11**: 49-69.
- Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T. and Cambra, M. (2011) Plum pox virus: 185-197. In: *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T. and Jelkmann, W. APS Press, Minnesota, USA.
- Bowtell, D. and Sambrook, J. (2003). *A Molecular Cloning Manual - DNA Microarrays*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C. and Little, S. (1997). The elimination of primer - dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research* **25** (16): 3235–3241.
- Cattani-Scholz, A., Pedone, D., Dubey, M., Neppl, S., Nickel, B., Feulner, P., Schwartz, J., Abstreiter, G. And Tornow, M. (2008). Organophosphonate-based PNA-functionalization of silicon nanowires for label-free DNA detection. *American chemical society Nano* **2** (8): 1653-1660.
- Debouck, C. and Goodfellow, P. N. (1999). DNA Microarrays in drug detection and development. *Nature Genetics* **21** (S-1): 48-50.

- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J. M. (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* **21** (S-1): 10-14.
- Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B. and Nielsen, P. E. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365** (6446): 566-568.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J. and Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews* **4** (13): 559-570.
- Fessehaie, A., De Boer, S. H. and Lévesque, C. A. (2002). An oligonucleotide array for identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. *Phytopathology* **93** (3): 262-269.
- Fonseca, F., Neto, J. D., Martins, V. and Nolasco, G. (2005). Genomic variability of Prune dwarf virus as affected by agricultural practice. *Archives of Virology* **150** (8): 1607–1619.
- Fritzsche, R. and Kegler, H. (1968). Nematoden als Vektoren von Viruskrankheiten der Obstgewächse. *Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin* **97**: 289-295.
- Fulton, R. W. (1952). Mechanical transmission and properties of Rose mosaic virus. *Phytopathology* **42**: 413-416.
- Fulton, R. W. (1957). Properties of certain mechanically transmitted viruses of Prunus. *Phytopathology* **47**: 683-687.
- Gallitelli, D. (2004). Nucleic acid-based assay for the diagnosis of viral pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* **43** (2): 221-227.
- George, J. A. and Davidson, T. R. (1963). Pollen transmission of Prunus necrotic ringspot and Sour cherry yellows viruses from tree to tree. *Canadian Journal of Plant Science* **43** (3): 276-288.

- Gershon, D. (2002). Microarray technology: an array of opportunities. *Nature* **416** (6883): 885-891.
- Gibriel, A. A. (2012). Options available for labelling nucleic acid samples in DNA microarray-based detection methods. *Briefings in Functional Genomics* **11** (4): 311-318.
- Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T. and Šubr, Z. (2004). Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology* **85** (9): 2671–2681.
- Cox, W. G., Beaudet, M. P., Agnew, J. Y. and Ruth, J. L. (2004). Possible sources of dye-related signal correlation bias in two-color DNA microarray assays. *Analytical Biochemistry* **331** (2): 243-254.
- Grimová, L., Winkowská, L., Ryšánek, P., Svoboda, P. and Petrzik, K. (2013). Reflects the coat protein variability of Apple mosaic virus host preference? *Virus Genes* **47** (1): 119–125.
- Grover, V., Pierce, M. L., Hoyt, P., Zhang, F. and Melcher, U. (2010). Oligonucleotide-based microarray for detection of plant viruses employing sequence-independent amplification of targets. *Journal of Virological Methods* **163** (1): 57-67.
- Hadidi, A., Czosnek, H. and Barba, M. (2004). DNA microarrays and their potential applications for the detection. *Journal of Plant Pathology* **86** (2): 97-104.
- Heller, M. J. (2002). DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* **4**: 129-153.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. and Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* **3** (23): 504-511.

- Hughes, T. R., Mao, M., Jones, A. R., Burchard, J., Marton, M. J., Shan, K. W., Lefkowitz, S. M., Ziman, M., Schelter, J. M., Meyer, M. R., Kobayashi, S., Davis, C., Dai, H., He, Y. D., Stephanians, S. B., Cavet, G., Walker, W. L., West, A., Coffey, E., Schoemaker, D. D., Stoughton, R., Blanchard, A. P., Friend, S. H. and Linsley, P. S. (2001). Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature Biotechnology* **19** (4): 342-347.
- Chen, D., Juárez, S., Hartweck, L., Alamillo, J. M., Simón-Mateo, C., Pérez, J. J., Fernández-Fermández, M. R., Olszewski, N. E. and García, J. A. (2005). Identification of secret agent as the O-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection. *Journal of Virology*, **15** (79): 9381–9387.
- Cheung, V. G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R. and Childs, G. (1999). Making and reading microarrays. *Nature Genetics* **21** (S-1): 15-19.
- Ideker, T., Ybarra, S. and Grimmond, S. (2003). Hybridization and posthybridization washing: 228-236. In: *A Molecular Cloning Manual: DNA Microarrays*. Bowtell and Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Kulshrestha, S., Verma, N., Hallan, V., Raikhy, G., Singh, M. K., Ram, R. and Zaidi, A. A. (2005). Detection and identification of Prunus necrotic ringspot virus in Pelargonium. *Australasian Plant Pathology* **34** (4): 599-601.
- Lenz, O. (2001). *Molekulární detekce viru mozaiky jabloně v planých i kulturních hostitelích*. Bakalářská práce. České Budějovice, Biologická fakulta JČU, 25 s.
- Lenz, O. (2011). ústní sdělení.
- Lenz, O. et al. (2013). Nепublikované údaje.
- Lenz, O., Petrzik, K. and Špak, J. (2008). Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses. *Journal of Virological Methods* **148** (1-2): 96-105.

- Leski, T. A., Lin, B., Malanoski, A. P., Wang, Z., Long, N. C., Meador, C. E., Barrows, B., Ibrahim, S., Hardick, J. P., Aitichou, M., Schnur, J. M., Tibbetts, C. and Stenger, D. A. (2009). Testing and validation of high density resequencing microarray for broad range biothreat agents detection. *PLoS ONE* **4** (8): e6569.
- Lin, B., Wang, Z., Vora, G. J., Thornton, J. A., Schnur, J. M., Thach, D. C., Blaney, K. M., Ligler, A. G., Malanoski, A. P., Santiago, J., Walter, E. A., Agan, B. K., Metzgar, D., Seto, D., Daum, L. T., Krutzelock, R., Rowley, R. K., Hanson, E. H., Tibbetts, C. and Stenger, D. A. (2006). Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays. *Genome Research* **16** (4): 527-535.
- Matic, S., Sánchez-Navarro, J. A., Mandic, B., Myrta, A. and Pallás, V. (2008). Tracking three Ilarviruses in stone fruit trees throughout the year by ELISA and tissue-printing hybridization. *Journal of Plant Pathology* **90** (1): 137-141.
- McLoughlin, K. S. (2011). Microarrays for pathogen detection and analysis. *Briefings in Functional Genomics* **10** (6): 342-353.
- Miller, N. A., Gong, Q., Bryan, R., Ruvolo, M., Turner, L. A. and LaBrie, S. T. (2002). Cross-hybridization of closely related genes of high-density macroarrays. *BioTechniques* **32** (3): 620-625.
- Mink, G. I., Howell, W. E., Cole, A. and Regev, S. (1987). Three serotypes of Prunus necrotic ringspot virus isolated from rugose mosaic-diseased sweet cherry in Washington. *Plant Disease* **71** (1): 91-93.
- Mockler, T. C. and Ecker, J. R. (2005). Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics* **85** (1): 1-15.
- Moury, B., Cardin, L., Onesto, J., Candresse, T. and Poupet, A. (2001). Survey of Prunus necrotic ringspot virus in Rose and its variability in Rose and Prunus spp. *Phytopathology* **91** (1): 84-91.
- Murphy, D. (2002). Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects. *Advances in Physiology Education* **26** (4): 256-270.

- Navrátil, M. (2006). Plum pox virus in the Czech republic. *Bulletin European and Mediterranean Plant Protection Organization* **36** (2): 208.
- Nicolaisen, M. (2011). An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viruses. *Journal of Virological Methods* **173** (1): 137-143.
- Pasquini, G., Barba, M., Hadidi, A., Faggioli, F., Negri, R., Sobol, I., Tiberini, A., Caglayan, K., Mazyadf, H., Anfoka, G., Ghanim, M., Zeidan, M. and Czosnek, H. (2008). Oligonucleotide microarray-based detection and genotyping of Plum pox virus. *Journal of Virological Methods* **147** (1): 118-126.
- Paunovic, S., Pasquini, G. and Barba M. (2011). Apple mosaic virus in Stone Fruits: 91-95. In: *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T. and Jelkmann, W. APS Press, Minnesota, USA.
- Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P. and Fodor, S. P. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (11): 5022-5026.
- Petrzik, K. (2005). Capsid protein sequence gene analysis of Apple mosaic virus infecting pears. *European Journal of Plant Pathology* **111** (4): 355–360.
- Petrzik, K. and Lenz, O. (2011) Apple mosaic virus in Pome Fruits: 25-29. In: *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits*. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T. and Jelkmann, W. APS Press, Minnesota, USA.
- Petrzik, K., Vondrák, J., Barták, M., Peksa, O. and Kubešová, O. (2013). Lichens - a new source or yet unknown host of herbaceous plant viruses? *European Journal of Plant Pathology* [online].
- Polák, J. (2006). Hosts and symptoms of Plum pox virus: woody species other than fruit and ornamental species od Prunus. *Bulletin European and Mediterranean Plant Protection Organization* **36** (2): 225-226.
- Polák, J. (2009). Influence of climate changes in the Czech Republic on the distribution of plant viruses and phytoplasmas originally from the Mediterranean subtropical region. *Plant Protection Science* **45**: S20-S26.

- Polák, J. and Komínek, P. (2009). Distribution of Plum pox virus strains in natural sources in the Czech Republic. *Plant Protection Science* **45** (4): 144-147.
- Polz, M. F. and Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **64** (10): 3724–3730.
- Proebsting, E. L., Ophardt, D., Howell, W. E., Mink, G. I. and Patten, K. D. (1995). Variation in horticultural traits of ‘Bing’ sweet cherry associated with Ilarvirus infection. *American Society for Horticultural Science* **30** (2): 333-335.
- Proeseler, G. (1968). Übertragungsversuche mit dem latenten Prunus-Virus und der Gallmilbe *Vasates fockeui* Nal. *Journal of Phytopathology* **63** (1): 1-9.
- Ruau, D. and Zenke, M. (2008). Gene arrays for gene discovery: 23-36. In: *Bioengineering in Cell and Tissue Research*. Artmann and Chien. Springer, Germany.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74** (12): 5463-5467.
- Shiel, P. J. and Berger, P. H. (2000). The complete nucleotide sequence of Apple mosaic virus (ApMV) RNA 1 and RNA 2: ApMV is more closely related to Alfalfa mosaic virus than to other Ilarviruses. *Journal of General Virology* **81** (1): 273-278.
- Shiller, J. B., Lebas, B. S., Horner, M., Pearson, M. N. and Clover, G. R. (2010). Sensitive detection of viruses in pollen using conventional and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* **158** (11-12): 758–763.
- Sochor, J., Babula, P., Adam, V., Krška, B. and Kizek, R. (2012). Sharka: the past, the present and the future. *Viruses* **4** (11): 2853-2901.
- Svoboda, J. and Polák, J. (2010). Relative concentration of Apple mosaic virus coat protein in different parts of apple tree. *Horticultural Science (Prague)*, **37** (1): 22-26.
- Šíp, M., Bystřická, D., Kmoch, S., Nosková, L., Hartmannová, H. and Dědič, P. (2010). Detection of viral infections by an oligonucleotide microarray. *Journal of Virological Methods* **165** (1): 64–70.

- Šubr, Z. and Glasa, M. (2008). Plum pox virus variability detected by the advanced analytical methods. *Acta Virologica* **52** (2): 75–90.
- Tzanetakis, I. E. and Martin, R. R. (2008). A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. *Journal of Virological Methods* **149** (1): 167-170.
- Uyemoto, J. K. and Scott, S. W. (1992). Important diseases of Prunus caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant Disease* **76** (1): 5-11.
- Valverde, R. A., Nameta, S. T. and Jordan, R. L. (1990). Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* **74** (3): 255-258.
- Vašková, D., Petrzik, K. and Karešová, R. (2000a). Variability and molecular typing of the woody-tree infecting Prunus necrotic ringspot Ilarvirus. *Archives of Virology* **145** (4): 699-709.
- Vašková, D., Petrzik, K., and Špak, J. (2000b). Molecular variability of the capsid protein of the Prune dwarf virus. *European Journal of Plant Pathology* **106** (6): 573–580.
- Verma, N., Hallan, V., Ram, R., and Zaidi, A. A. (2002). Detection of Prunus necrotic ringspot virus in Begonia by RT - PCR. *Plant Pathology* **51** (6): 800.
- Waring, J. F., Ciurlionis, R., Jolly, R. A., Heindel, M. and Ulrich, R. G. (2001). Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicology Letters* **120** (1-3): 359–368.

9. Přílohy

9.1 Primery

- převzaté primery (Lenz et al, 2008)

Primer	Sekvence (5'-3')	Cílené kotvy	Velikost amplikonu (bp)
ApMV	GGCCATTAGCGACGATTAGTC	ApMV 1, 2, 3, 5	821
ApMV - R	ATGCTTTAGTTCCTCTCGG		
PDV	AAGAAGAGAAGTCCGACAAG	PDV 1, 5, 6	847
PDV - R	AGCAGCATTTCCAACACTACGA		
PNRSV	GCCGAATTTGCAATCATACC	PNRSV 1, 5, 6	833
PNRSV - R	GGGGCATCCACAACCTTAC		
PPV	TAGCTACAGCTTGCCACTTTC	PPV 1	848
PPV - R	CGACCAGCTTAACTCTTTCC		

(Převzato a upraveno dle Lenz et al., 2008)

- navržené primery

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Cílené kotvy	Velikost amplikonu (bp)
ApMV- F	GAAAATTCCGAGAGGTCACA	ApMV 1, 2, 3, 5	320
ApMV - R	CCAACCTAAACTTCCTCACG		
PDV – F	CGATTGGTTAACTCACTTTG	PDV 5	288
PDV - R	GTACGAGATATCATACCGG (Vašková et al., 2000)		
PNRSV – F	CCTCCCCGAATTCCTAAGGG	PNRSV 1, 5,	349
PNRSV - R	GCACTTCGGTCTTGAATT		
PPV – F	GCTTTGCTAGTGATACATTGG	PPV 1	306
PPV - R	GTGAAACTTTGGCTGCAAGTG		
Univerzální - F	GTACGCCGGAGCTAG	-	-
Univerzální - R	GTTACGAGCGCGTGA (Lenz, nepublikované údaje)		

9. 2 Rozpis programů PCR reakce pro jednotlivé viry

ApMV		
Teplota [°C]	Čas [min]	
94	2:00	
94	0:30	
54	0:30	
72	0:30	35 cyklů
72	10:00	
4	∞	

PPV		
Teplota [°C]	Čas [min]	
94	2:00	
94	0:30	
50	1:00	35 cyklů
72	1:30	
72	10:00	
4	∞	

PNRSV		
Teplota [°C]	Čas [min]	
94	2:00	
94	0:30	
57	0:30	
72	0:30	35 cyklů
72	10:00	
4	∞	

PDV		
Teplota [°C]	Čas [min]	
94	2:00	
94	0,30	
55	1:00	
72	1:30	35 cyklů
72	10:00	
4	∞	

Reamplifikace		
Teplota [°C]	Čas [min]	
94	2:00	
94	0,30	
53	1:00	30 cyklů
72	1:30	
72	10:00	
4	∞	

9.3 Pozice jednotlivých kotev na mikročipu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ia	IIc	IIIa2	IVa	567a2	VIIa2	VIIa2	IXa	Xe	XIIa	PDV1	PNRSV5
B	Ib	IIId2	IIIb2	IVb	Va	VIIb2	VIIb2	IXb	Xf	XIIb	PDV4	PNRSV6
C	Anti_Ia	Anti_IIc	Anti_IIIa2	Anti_IVa	Vb	VIIc	VIIc	IXc	Xg	XIIc	PDV5	PDV5
D	Anti_Ib	Anti_IIId2	Anti_IIIb2	Anti_IVb	Anti_567a2	VId	Anti_VIIa2	Anti_IXa	Anti_Xe	XIIId	PDV1	PDV4
E	ApMV1	ApMV2	ApMV3	ApMV5	Anti_Va	Anti_VIIa2	Anti_VIIb2	Anti_IXb	Anti_Xf	Anti_XIIa	VIIa2	XIIa
F	ASPV1	PPV1	PNRSV1	ASPV3	Anti_Vb	Anti_VIIb2	Anti_VIIc	Anti_IXc	Anti_Xg	Anti_XIIb	VIIb2	XIIb
G	ASPV3	PNRSV1	PPV1	ASPV1	567a2	Anti_VIc	Xe	IXa	VIIa2	Anti_XIIc	VIIc	XIIc
H	ApMV5	ApMV3	ApMV2	ApMV1	Va	Anti_VId	Xf	IXb	VIIb2	PNRSV5	VId	XIIId
I	Ia	IIIa2	IIc	IVa	Vb	Voda	Xg	IXc	VIIc	PNRSV6	Anti_VIIa2	Anti_XIIa
J	Ib	IIIb2	IIId2	IVb	Anti_567a2	ASGV3	Anti_Xe	Anti_IXa	Anti_VIIa2	ASGV1	Anti_VIIb2	Anti_XIIb
K	Anti_Ia	Anti_IIIa2	Anti_IIc	Anti_IVa	Anti_Va	ASGV2	Anti_Xf	Anti_IXb	Anti_VIIb2	ASGV2	Anti_VIc	Anti_XIIc
L	Anti_Ib	Anti_IIIb2	Anti_IIId2	Anti_IVb	Anti_Vb	ASGV1	Anti_Xg	Anti_IXc	Anti_VIIc	ASGV3	Anti_VId	Voda

Žlutě vyznačeny místa na mikročipu hybridizující po použití převzatých primerů (Lenz et al., 2008), silněji vyznačeny místa na mikročipu po hybridizování vzorků připravených navrženými primery.

9. 4 Sekvence jednotlivých kotev na používaném mikročipu

Virus	Číslo kotvy	Sekvence (5' - 3')	Gen
ApMV	1	TCCGAATCCGATGGACCAGAAAAGGCTTCAAGAAGGACCAA	CP
	2	ATACCTTCATAATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAATGG	
	3	GACTTTGCCGATGCTTCCGGTATCTGCTAGAGAAGGATT	
	5	ATTGACTTTGCCGATGCTTTCGGTATCTTTTGGAG	
	1	AACATACCCTGGTTGGAGGTCTTGAAGTGGATAAAGTGTGAT	
PNRSV	1	TTCGAATGGTTGGATTGGGATGGTGGAGGACTATAA	CP
	5	TCCGACTGATGCTTGTGGTGGATGAAGACCCTGCTTGAG	
	6	CATAATCACCGAGAGGTGACGACGACAGAGGCAGTGAAGT	
PDV	1	TTGTCTCCGTTACTGCCTTGATGTTTCTAATGGTGTCTA	CP
	4	AATCCCCTACAACGTTAGGAAGTTCACAGCGAAAACAAGCCA	
	5	CTATTTCCGAGTGGATGCTTCACGGACCAAAATGTGCCCGT	

Kotvy byly používány v publikaci (Lenz et al, 2008).