UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 086

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/70	(2006.01)
C12Q 1/6844	(2018.01)
C12N 15/34	(2006.01)
G01N 21/80	(2006.01)
C12R 1/94	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35258**

(22) Přihlášeno: **10.08.2018**

(47) Zapsáno: **18.09.2018**

(73) Majitel:
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Praha 6, Lysolaje, CZ

(72) Původce:
Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D., Praha 6, Bubeneč, CZ
Dr. rer. nat. Ing. Helena Plchová, Praha 6, Dejvice, CZ
doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc., Praha 6, Ruzyně, CZ
Renata Hadámková, Praha 8, CZ

(54) Název užitného vzoru:

Sada primerů pro detekci Viru zakrslosti pšenice (WDV) metodou LAMP

CZ 32086 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Sada primerů pro detekci Viru zakrslosti pšenice (WDV) metodou LAMP

Oblast techniky

Řešení se týká sady primerů, které jsou vhodné pro detekci *Viru zakrslosti pšenice* (WDV) pomocí metody LAMP. Sada primerů je navržena v genu pro obalový protein viru. Primery jsou odvozeny od genu pro obalový protein polského izolátu Pol-WDV-W a jsou schopné detekovat DNA viru pomocí LAMP.

Dosavadní stav techniky

Ekonomicky velmi významný Virus zakrslosti pšenice (WDV), druh rodu *Mastrevirus*, patří do čeledi *Geminiviridae*. WDV infikuje pšenici, ječmen, oves i žito. Infekce WDV se projevuje zakrslým růstem, redukovaným množstvím listů a chlorózou. WDV je přenášen perzistentně křísky, u náchylných odrůd způsobuje ztráty na výnosu o 80 až100 % (Chrpová a další, 2017).

WDV vytváří zdvojené částice s dvěma kvazi-ikosahedrálními polovinami, které obsahují jednovláknovou cirkulární DNA viru o velikosti 2,6 až 2,8 kb (Boulton, 2002). Po vstupu do rostlinné buňky se tvoří dvouvláknová DNA, která slouží jako templát pro obousměrnou transkripci genů viru. Transkripce začíná ve velké mezigenové oblasti (LIR) a končí v malé mezigenové oblasti (SIR), kdy se vytvoří oba transkripty - virionový (V) a komplementární (S). Virový transkript kóduje dva geny pro pohybový a obalový protein. Z komplementárního transkriptu vznikají pomocí sestřihu dva replikační proteiny (Rep a RepA). (Wright a další, 1997).

Běžnou metodou detekce rostlinných virů je ELISA. Detekční limit ELISA rostlinných virů je v rozmezí 1 a ž 1 0 ng/ml (Clark a Adams, 1977; Clark a další, 1986). Nově byly vyvinuty dvě sérologické metody založené na monoklonální protilátce pro detekci WDV (Zhang a další, 2018). Dalšími metodami jsou metody založené na PCR (Jaňourová a další, 2009; Zhang a další, 2017; Trzmiel a Klejdysz, 2018) či real-time PCR (Zhang a další, 2010; Gadiou a další, 2012**).**

Novou metodu detekce WDV představuje izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (Loop mediated isothermal amplification, LAMP). Metoda LAMP má několik výhod na rozdíl od běžné PCR. K amplifikaci dochází při stálé teplotě. Tato metoda je navíc rychlejší než běžná PCR a užitím speciálně navržených loop-primerů lze rychlost amplifikace ještě zvýšit. Pomocí této metody lze získat i více produktu než u PCR. Pro detekci WDV není tudíž třeba drahého vybavení a amplifikaci lze provádět mimo laboratoř.

Podstata technického řešení

Použití této metody umožňuje sada primerů pro detekci WDV. Primery jsou vhodné pro izotermální amplifikaci zprostředkovanou smyčkou (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) s použitím Bst 2.0 WarmStart DNA polymerasy a phenol red podle technického řešení, jehož podstatou je složení primerů:

WDV-F3: CCAGACGCCACTGACATC,
WDV-B3: GTCCACGATATTCTTGCCGA,
WDV-FIP: GAATCGATGCGACCAAGCACGT-TACGATGCCTTGGAATCTGC,
WDV-B1P: AGGAAGTGGACCGTGAACCTTG-CTACCCAGTTGTAGCGTTGG,
WDV-LF: ACAGTCCACGTACTCGGC,
WDV-LB: TTACTGATGGACGGAAGGTCGGG.

Původci navržené primery umožňují rychlou a levnou detekci virové DNA, jak bylo ověřeno při pokusech v Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Praha. V našich pokusech jsme použili tyto primery pro detekci izolované WDV DNA.

Následující příklad provedení dokládá použití sady primerů pro detekci *Viru zakrslosti pšenice* (WDV).

Příklad uskutečnění technického řešení

Detekce izolované WDV DNA

Podle počtu analyzovaných vzorků se nejprve připraví premix obsahující veškeré reakční složky kromě templátové DNA, čímž se minimalizují odchylky dané nepřesností v pipetování. Složení výsledné reakční směsi pro LAMP detekci WDV DNA je pak například toto:

1 µl primery WDV-FIP + WDV-BIP (40 µM), výsledná koncentrace 1,6 µM
1 µl primery WDV-F3 + WDV-B3 (5 µM), výsledná koncentrace 0,2 µM
1 µl primery WDV-LF + WDV-LB (10 µM), výsledná koncentrace 0,4 µM
12,5 µl WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB)
1 µl WDV DNA
8,5 µl H_20

Celkem má výsledná reakční směs 25 µl.

Mikrozkumavky se vzorky se důkladně uzavřou, směs se centrifugací zakoncentruje na dně mikrozkumavky a mikrozkumavky se vloží do inkubátoru. LAMP se provádí 1 h při 65 °C. Systém umožňuje rychlou a jednoduchou vizuální detekci pomocí pH indikátoru Phenol red.

Průmyslová využitelnost

Řešení se týká rychlé detekce izolované DNA závažného patogena obilnin - *Viru zakrslosti pšenice* (WDV), založené na amplifikaci specifického úseku genu pro obalový protein. Vybraný úsek genu je relativně sekvenčně konzervovaný mezi většinou izolátů WDV z Německa, Maďarska a Francie, čímž se stává vhodným nástrojem pro detekci tohoto patogena. Nové primery mají využití například v rostlinolékařství při diagnostice patogena WDV.

Reference:

Boulton Ml (2002) Functions and interactions of mastrevirus gene products. Mol Plant Pathol 60: 243-255.

Chrpová J, Sumíková T, Palicová J, Kumar J, Váňová M, Bílovský J, Veškrna O (2017) Ochrana obilnin proti virovým chorobám (BYDV a WDV). Metodika pro praxi. VÚRV, Praha 6 - Ruzyně, ISBN 978-80-7427-250-9.

Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J Gen Virol 34: 475-483.

Clark MF, Lister RM, Bar-Joseph M (1986) ELISA technique. Methods in Enzymol 118: 742-766.

Gadiou S, Ripl J, Jaňourová B, Jarošová J, Kundu JK (2012) Real-time PCR assay for the discrimination and quantification of wheat and barley strains of Wheat dwarf virus. Virus Genes

44: 349-355.

Jaňourová B, Ripl J, Kumar J (2009) Metodika molekulární detekce pšeničného a ječného kmene viru zakrslosti pšenice v jejich vektoru křísku polním pomocí PCR - RFLP. VÚRV, Praha 6 - Ruzyně, ISBN 978-80-7427-027-7.

Trzmiel K, Klejdysz T (2018) Detection of barley- and wheat-specific forms of *Wheat dwarf virus* in their vector *Psammotettix alienus* by duplex PCR assay. J Plant Protect Res 58: 54- 57.

Wright EA, Heckel T, Groenendijk J, Davies JW, Boulton MI (1997) Splicing features in maize streak virus virion- and complementary-sense gene expression. Plant J 12: 1285-1297. Zhang M, Chen R, Zhou X, Wu J (2018) Monoclonal antibody-based serological detection methods for Wheat dwarf virus. Virologica Sinica 33: 173-180.

Zhang P, Liu Y, Liu W, Massart S, Wang Y (2017) Simultaneous detection of wheat dwarf virus, northern cereal mosaic virus, barley yellow striate mosaic virus and rice black-streaked dwarf virus in wheat by multiplex RT-PCR. J Virol Methods 249: 170-174.

Zhang X, Zhou G, Wang X (2010) Detection of wheat dwarf virus (WDV) in wheat and vector leafhopper (Psammotettix alienus Dahlb.) by real-time PCR. J Virol Methods 169: 416-419.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada primerů pro detekci DNA Viru zakrslosti pšenice (WDV) metodou LAMP, **vyznačující se tím, že** obsahuje primery o složení

WDV-F3: CCAGACGCCACTGACATC,
WDV-B3: GTCCACGATATTCTTGCCGA,
WDV-FIP: GAATCGATGCGACCAAGCACGT-TACGATGCCTTGGAATCTGC,
WDV-BIP: AGGAAGTGGACCGTGAACCTTG-CTACCCAGTTGTAGCGTTGG,
WDV-LF: ACAGTCCACGTACTCGGC,
WDV-LB: TTACTGATGGACGGAAGGTCGGG,

které umožní amplifikaci žádaného fragmentu patogena.