

STANOVENIE TOBAMOVÍRUSOV NA PROTEOMICKEJ ÚROVNI



Piešťany, 2019

Obsah

1. Úvod	1
2. Prehľad	2
2.1 Súčasný stav riešenej problematiky	2
2.2 Rastlinné vírusy	3
2.3 Tobamovírusy	3
2.3.1 Molekulárna charakteristika Tobamovírusov	3
2.3.2 Životný cyklus Tobamovírusov	5
2.4 Vírus mozaiky rajčiaka jedlého	5
2.4.1 Ochorenia spôsobené vírusom mozaiky rajčiaka jedlého	7
3. Diagnostické metódy	8
3.1 Imunochemické metódy	8
3.1.1 ELISA (Enzyme linked ImmunoSorbent assay)	9
3.2 Dot immunoblotting assay (DIBA)	12
3.3 Tissue immunoblotting assay (TIBA)	12
3.4 Western blot	12
3.5 Metódy založené na analýze nukleových kyselín	12
3.5.1 Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase chain reaction)	13
3.5.1.1 Real - time PCR	15
3.5.2 Hybridizácia nukleových kyselín	16
4. Ciele práce	19
5. Materiál a metódy	20
5.1 Chemikálie	20
5.1.1 Zloženie roztokov používaných pri umelej infekcii ToMV PV - 0135	20
5.2 Prístroje	22
5.3 Biologický materiál	22
6.1 Metódy a postupy	22
6.1.1 Príprava vírusového inokula ToMV PV - 0135 (DSMZ)	22
6.1.2 Kultivácia rastlinného materiálu	23
6.1.3 Presádzanie a umiestnenie rastlín	23
6.1.4 Postup umelej vírusovej infekcie	23
6.1.5 Počítačová molekulárno - biologická analýza ToMV	25
6.1.6 Imunizácia zvierťa	28
6.1.7 Optimalizácia riadenia polyklonálnej protilátky založená na detekcii zmesi synteticky pripravených epitopov Ep1 + Ep2	28

6.1.8 Izolácia proteínov z infikovaných odrôd rajčiaka jedlého	29
6.1.9 Meranie koncentrácie proteínov pomocou BCA protein assay kit	29
6.1.10 Stanovenie prítomnosti kapsidového proteínu ToMV PV - 0135 pomocou imunodetekcie DAS - ELISA	30
6.1.11 Postup Western blotting analýzy	32
6.1.12 Kvantifikácia výsledkov z analýz Western blot prostredníctvom programu Image Studio Lite	33
7 Výsledky a diskusia	34
7.1 Optimalizácia riadenia polyklonálnej protilátky založená na detekcii zmesi synteticky pripravených epitopov Ep1 + Ep2 v podmienkach „in vitro“	34
7.3 Meranie koncentrácie proteínov pomocou BCA protein assay kit	35
7.4 Stanovenie prítomnosti kapsidového proteínu ToMV PV - 0135 komerčnými protilátkami (DSMZ, Bioreba) a „našou protilátkou“ pomocou imunodetekcie DAS - ELISA	37
7.5 Stanovenie miery špecificity „našej“ protilátky na prítomnosť kapsidového proteínu ToMV PV - 0135 pomocou analýzy Western blot	40
7.6 Vyhodnotenie výsledkov kvantifikácie z Western blot analýz na vybraných odrodách rajčiakov jedných (Salus, Niki a Oskar)	43
8 Záver	47
9. Zoznam použitej literatúry	49

1. Úvod

Cieľom predloženej práce bolo zhodnotenie výskytu tobamovírusov a ich detekcia na proteomickej úrovni v poľných a experimentálnych podmienkach na modelovej plodine rajčiaka jedlého pomocou dostupných imunochemických a molekulárnych diagnostických testov počas riešenia projektu APVV-14-0055 „Efektívna diagnostika vírusov ohrozujúcich produkciu rajčiaka jedlého na Slovensku“.

Aktuálnosť práce vyplýva z rizika nedostatku informácií o vírusových patogénoch z rodu *Tobamovirus* cirkulujúcich na území Slovenska na rajčiakoch, reálnej hrozby introdukcie nových patotypov/kmeňov tobamovírusov, vysokej molekulárnej variability tobamovírusov a z toho vyplývajúcej nedostatočnej polyvalentnosti súčasných diagnostických metód, možného výskytu latentných alebo zmiešaných infekcií a absencii poznatkov o citlivosti v súčasnosti pestovaného genofondu k týmto hospodársky dôležitým vírusom.

Táto práca vznikla za finančnej podpory projektu APVV-14-0055“ z Agentúry na podporu výskumu a vývoja.

Autorský kolektív štúdie:

Mgr. Daniel Mihálik, PhD.^{1,4}

Ing. Miroslav Glasa, DrSc.²

Mgr. Michaela Mrkvová³

Ing. Jozef Gubiš, PhD.⁴

¹ Žilinská univerzita v Žiline - Výskumný ústav vysokohorskej biológie, 059 56 Tatranská Javorina 7

² Biomedicínske centrum SAV, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

³ Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied UCM, Nám. J. Herdu 2, 91701 Trnava

⁴ Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby,
Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

2. Prehľad

Rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum* L.) predstavuje vďaka svojim nutričným vlastnostiam a využiteľnosti pre priemyselné spracovanie ekonomicky atraktívnu poľnohospodársku plodinu. Na Slovensku sa v roku 2017 vyprodukovalo približne 21,9 tisíc ton tejto zeleniny (Definitívna úroda poľnohospodárskych plodín za rok 2017 za poľnohospodárstvo, 2018), pričom ročná spotreba na jedného obyvateľa SR je asi 17 kg. Ako v prípade iných poľnohospodárskych plodín je pestovanie rajčiaka vystavené škodlivým účinkom spektra fytopatogénov (huby, baktérie, viroidy, vírusy).

Vírusová infekcia rastlín predstavuje závažný problém v oblasti poľnohospodárstva. Prakticky každý rastlinný druh pestovaný za účelom potravín a krmív je náchylný k infekcii aspoň jedného z viac ako 500 známych rastlinných vírusov. Tieto rastlinné patogény svojou infekciou spôsobujú ekonomické straty v celej škále plodín, tým že znižujú výnosy a negatívne ovplyvňujú kvalitu úrody. Dôraz sa kladie na rastlinné vírusy infikujúce významné, poľnohospodárske plodiny (napríklad vírus mozaiky rajčiaka, vírus mozaiky tabaku). Avšak aj divoko rastúce rastliny predstavujú široký zoznam hostiteľských systémov pre vírusy. Existuje mnoho prostriedkov, či už klasické, šľachtiteľské alebo moderné metódy génového inžinierstva. Pomocou nich, je možné tieto fytopatogény včasne monitorovať resp. úplne inhibovať, čím sa zabezpečí ochrana rastliny pred jeho napadnutím. Podstatou procesov pri šľachtiteľských metódach je získanie populácie geneticky modifikovaných jedincov, ktorý poskytujú nielen vysokú kvalitu úrody, ale aj odolnosť voči chorobám. Pri metódach na molekulárno - biologickej úrovni ide o včasnú diagnostiku rastlinných vírusov napadajúcich plodiny, resp. zabezpečenie stavu rezistencie rastliny, kedy je rastlina odolná voči infekcii vírusom. Mnoho prác a experimentov sa v dnešnej dobe venuje štúdiu génov rezistencie daného vírusu. Táto cesta sa však pri niektorých patotypoch preukázala ako neúčinná, v dôsledku len dočasnej ochrany rastliny ako aj ľahkej prekonateľnosti prestupu vírusu do rastliny. Z toho dôvodu sa metódy génového inžinierstva stali účinným prostriedkom a zabezpečili tak, v istom zmysle prakticky neexistujúci efektívny spôsob chemickej pesticídnej ochrany. Medzi metódy molekulárno - biologické patria imunochemické metódy (ELISA, Western - blotting, Dot immunoblotting assay a Tissue immunoblotting assay) a metódy založené na analýze nukleových kyselín (RT - PCR).

2.1 Súčasný stav riešenej problematiky

Existencia rastlinných vírusov spôsobuje obrovské straty vo výnosoch a kvalite plodín na celom svete. Napríklad vírus spôsobujúci škvrnité vädnutie rajčiaka (TSWV) infikujúci rajčiak jedlý, spôsobuje straty odhadované do výšky jednej miliardy amerických dolárov ročne (Webster a kol., 2004). Straty spôsobené vírusom mozaiky rajčiaka jedlého (ToMV) dostupná literatúra však neuvádza. ToMV sa považuje za najrozšírenejší vírus napádajúci rajčiak jedlý, možno jeho straty niekoľkokrát znásobiť oproti stratám spôsobeným TSWV. Genetická variabilita a pokročilý vývoj populácie patogénov vyvoláva čoraz väčšiu snahu v rozvoji špecifických diagnostických nástrojov. Vzbudzuje tiež prísnejšie kritéria pre kontrolu infikovaných rastlín a ich potenciálnych prenášačov. Rastlinné RNA vírusy majú veľký potenciál pre vývoj a prispôbenie sa daným podmienkam, vzhľadom k ich rýchlej replikácii, početnosti a vysokej miere mutácií (Rangel a kol., 2011). Genetická variácia vyvolaná mutáciami môže byť obmedzená, alebo formovaná prírodným výberom, genetickým driftom a genetickým tokom (Moya a kol., 2004). Scholthof a kol. (2011) publikovali rebríček 10 rastlinných vírusov, ktoré sú významné z hľadiska ekonomického a vedeckého. Zoznam obsahuje rastlinné vírusy v určenom poradí: (1) Vírus mozaiky tabaku (*Tobacco mosaic virus*); (2) Vírus spôsobujúci škvrnité vädnutie rajčiaka (*Tomato spotted wilt virus*); (3) Vírus žltej kučeravosti listov rajčiaka (*Tomato yellow leaf curl virus*); (4) Vírus mozaiky uhorky (*Cucumber mosaic virus*); (5) Vírus zemiaka Y (*Potato virus Y*); (6) Vírus mozaiky karfiolu (*Cauliflower mosaic virus*); (7) Africký vírus mozaiky manioku (*African cassava mosaic virus*); (8) Šarka sliviek (*Plum pox virus*); (9) Vírus mozaiky stoklasu obilného (*Brome mosaic virus*); (10) Vírus zemiaka X (*Potato virus X*).

2.2 Rastlinné vírusy

Rastlinné vírusy sú označované ako infekčné, patogény ktoré sú príliš malé, aby mohli byť pozorované pod svetelným mikroskopom. Napriek svojej veľkosti dokážu vyvolávať príznaky vedúce k ochoreniu resp. usmrteniu rastlín. Najjednoduchšie vírusy sa skladajú z nukleových kyselín obalených proteínovým obalom. Okrem toho sú niektoré vírusové častice obalené vonkajšou membránou obsahujúcou lipidy a proteíny. Ako je to v prípade iných mikroorganizmov, aj rastlinné vírusy nesú svoju genetickú informáciu v nukleovej kyseline, ktorú typicky tvoria tri alebo viac proteínov. Všetky vírusy sú obligátne, tzn. závislé na bunkovej mašinérii ich hostiteľov, pričom mimo nich sú neaktívne. Majú schopnosť infikovať prakticky všetky druhy pestovaných a voľne rastúcich rastlín. Avšak hostiteľský rozsah môže byť pre jednotlivé typy rozličný, buď veľmi široký alebo zas veľmi úzky. Náchylnosť alebo rezistencia rastlinných druhov a odrôd na vírusy je určená predovšetkým rastlinným genotypom. Prirodzene, rastliny majú aktívne aj pasívne prostriedky na zabránenie infekcie vírusom. Pasívna obrana nastáva v dôsledku rastliny produkovať jeden alebo viacero hostiteľských faktorov, potrebných pre rozmnožovanie a šírenie vírusu v hostiteľovi. Na druhej strane, aktívna obrana zahŕňa detekciu a ničenie buniek infikovaných vírusom, vzhľadom k funkcii špecifických génov rezistencie v rastline. Za normálnych okolností gény rezistencie sú aktívne iba proti konkrétnemu vírusu. Okrem toho rastliny majú všeobecný obranný systém, ktorý je analogický s imunitným systémom zvierat (Gergerich a Dolja, 2006).

V závislosti na konkrétnej kombinácii vírusu a hostiteľa, ako aj na podmienkach prostredia, sa reakcia rastliny k infekcii môže pohybovať v rozmedzí od bezpríznakového stavu až k závažným ochoreniam a smrti. Hoci je vírus schopný sa replikovať v hostiteľskom systéme, nie vždy sa musí správať patogénne. Patogenéza nastáva vtedy, keď vírusová infekcia narušuje fyziológiu hostiteľa, čo spôsobuje vývojové abnormality a ďalšie fenotypové prejavy, ktoré sú považované za symptómy choroby (Pallas a García, 2011; Culver a Padmanabhan, 2007). V niektorých prípadoch sa tieto príznaky prejavujú ako nekrotické alebo chlorotické škvrny zvané miestne lézie, vyvíjajúce sa v mieste infekcie. Vo väčšine prípadov sa vírusy šíria po celej rastline, a tým spôsobujú systémovú infekciu (Gergerich a Dolja, 2006). Počiatky štúdií vírusov sa dajú od roku 1890 a to objavom akútneho infekčného agensu v tabaku prejavujúceho sa škvrnami na listoch. Vírus mozaiky tabaku (TMV) bol prvý charakterizovaný vírus patriaci do skupiny tobamovírusov. Predstavoval precedens pre vírusy ako pôvodca ochorenia rastlín (Beijerinck, 1898). Považuje sa za významný rastlinný patogén schopný napádať asi 200 druhov rastlín vrátane rajčiaka jedlého, uhorky siatej a okrasných kvetov. Stal sa tak najštudovanejším vírusom a modelovým organizmom pre vedecký výskum. Ďalším členom skupiny Tobamovírusov je taktiež dobre preskúmaný vírus mozaiky rajčiaka (ToMV), ktorý bol považovaný za patotyp TMV napádajúci rajčiak Ich vzájomná homologická podobnosť nukleotidovej sekvencie RNA predstavuje približne 80% (He a kol., 2012).

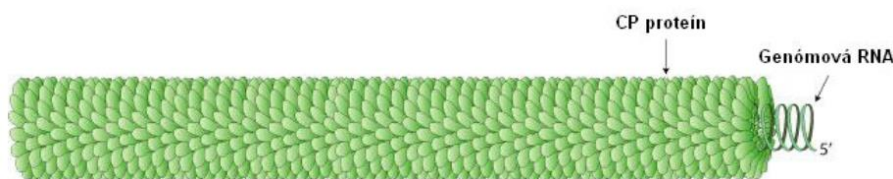
2.3 Tobamovírusy

Tvoria skupinu rastlinných „alpha – like“ vírusov patriacich do rodiny *Virgaviridae* (Lartey a kol., 1996). Tieto vírusy infikujú jednoklíčnolistové a dvojklíčnolistové rastliny vrátane mnohých dôležitých plodín ako sú paradajky a papriky, čo má za následok zníženú produkciu (Ishibashi a kol., 2012). Rod Tobamovírusov obsahuje viac ako 30 druhov vírusov vrátane ToMV a TMV. Ich výhodou je replikácia s vysokou účinnosťou. Napríklad počas jedného dňa dokážu vytvoriť ~ 106 kópií RNA, ktoré sú produkované v bunkách tabaku z niekoľkých molekúl rodičovského genómu. Výťažok nahromadených viriónov TMV predstavuje viac ako 1 g na 100 g čerstvých listov tabaku infikovaných TMV počas niekoľkých dní jednoduchým mechanickým očkovaním (Harrison a Wilson, 1999; Scholthof, 2004).

2.3.1 Molekulárna charakteristika Tobamovírusov

Virión charakterizujúci tento rod predstavuje tyčinkovitý tvar o dĺžke približne 300 nm a priemere 18 nm. Vo svojom genóme nesie lineárne, pozitívne (+) RNA vlákno o dĺžke ~ 6400

nukleotidov a obsahuje tiež ~ 2130 kópií obalového proteínu (CP) (Obrázok č.1) (Ishibashi a Ishikawa, 2016).

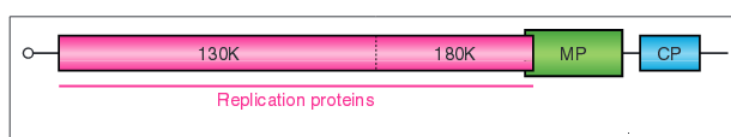


Obrázok č.1: Charakteristický virión tyčinkovitého tvaru rodu Tobamovírusov, obsahujúci jednoláknovú (+) RNA (~ 6400 nukleotidov) a obalový proteín (~2130 kópií)

(cit. 1: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/51.html, 2016 – 29 – 12).

Produktom priameho prekladu genómovej RNA sú proteíny 126K a 183K, ktoré sa podieľajú na replikácii vírusovej RNA (Ishibashi a kol., 2012; Ishikawa a kol., 1986; Dorokhov a kol., 1994). Vlákno proteínu 126K je na 5' konci chránené tzv. čiapkou (cap), preto má na tomto RNA konci naviazanú metyltransferázovú doménu, súčasťou vlákna je aj helikázová doména. Dlhší replikačný polypeptid 183K, obsahuje navyše C - terminálnu doménu známu ako RNA – dependentná RNA polymeráza. Okrem replikačnej funkcie sa vyššie uvedené proteíny vyznačujú schopnosťou viazať sa s malými dvojvláknovými RNA, čím potláčajú „tlmenie RNA molekúl“ (RNA silencing) (Lartey a kol., 1996; Kubota a kol. 2003; Kurihara a kol. 2007; Mérai a kol. 2006; Csorba a kol. 2007). Zaujímavou vlastnosťou 126K a 183K replikačných proteínov je, že neobsahujú transmembránové oblasti a preto existujú buď v rozpustenej forme alebo vo forme naviazanej na membránu (Hagiwara a kol. 2003).

Systémová infekcia rastlinným vírusom zahŕňa replikáciu pôvodne infikovaných buniek, s následným lokálnym pohybom vírusu z bunky do bunky prostredníctvom plazmodeziem (Ding a kol., 1992; Lucas a kol., 1993). Je dobre známe, že väčšina rastlinných vírusov kóduje jeden alebo viac proteínov, ktoré sa nazývajú pohybové proteíny (MPS). Tie sú považované za kľúčové proteíny pri prenose vírusu medzi bunkami (Tamai a Meshi, 2001). Aj skupina Tobamovírusov má vo svojom genóme obsiahnutý pohybový proteín (30K) spolu s ďalším, obalovým (CP) 17,5K proteínom. Vznikajú v procese prekladu jednotlivých subgenómových mRNA a sú postrádateľné pre replikáciu RNA (Obrázok č. 2) (Ishibashi a kol., 2012; Ishikawa a kol., 1986; Dorokhov a kol., 1994).



Obrázok č.2: Schématické zobrazenie genómu tobamovírusov. Proteíny 130K a 180K predstavujú replikačné proteíny, zatiaľ čo MP a CP reprezentujú pohybové a obalové proteíny (Ishibashi a kol., 2012).

Plazmodezmy predstavujú systém kanálikov umožňujúcich medzibunkový pohyb rastlinných vírusov. Nevyhnutná je však ich úprava, v dôsledku prestupu vírusu. Súhrne možno konštatovať, že stanovené funkčné charakteristiky pohybového (30K) proteínu sú nasledovné (Lucas, 2016):

- Naviazanie jednoláknovej RNA nešpecifickým spôsobom, pre vytvorenie stabilného ribonukleoproteínového komplexu.
- Indukcia pre zväčšenie limitujúcej veľkosti (SEL) plazmodeziem, pre prestup pomerne veľkých viriónov tobamovírusov.

- Samotné sprostredkovanie prechodu vírusu z bunky do bunky na krátke vzdialenosti.
V polovici štádia infekcie nadobúdajú pohybové proteíny nepravidelný, agregatívny tvar vo vnútri infikovaných buniek, pričom sú zapojené do endoplazmatického retikula (ER) a neskôr asociujú s mikrotubulami a mikrofilamentami (Padgett a kol., 1996; McLean a kol., 1995). To potvrdzuje hypotézu, že aj cytoskelet hostiteľskej bunky má veľký vplyv pri transporte vírusu (Zambryski, 1995; Carrington a kol. 1996). Lokalizácia MP proteínu s membránami endoplazmatického retikula je v súlade s výsledkami niekoľkých štúdií a naznačuje, že membrány ER pôsobia ako miesta vírusovej replikácie a syntézy proteínov vírusu (Asurmendi a kol., 2004; Heinlein a kol., 1998; Noueiry a Ahlquist, 2003). Počas infekcie, membrány ER agregujú za vzniku inklúzií, ktoré potom fungujú ako vírusové replikačné komplexy, ktoré obsahujú vRNA (vírusovú RNA) bez replikázy a MP proteínu (Heinlein a kol., 1998; Reichel a Beachy, 1998; Asurmendi a kol., 2004; Más a Beachy, 1999). Hoci sa zdá že agregáty ER, by mali byť v korelácii s prítomným MP proteínom, akumulácia týchto proteínov v inklúziách nie je nutná pre replikáciu a pohyb vRNA (Más a Beachy, 1999; Reichel a Beachy, 1998; Heinlein a kol., 1998; Boyko a kol., 2000). Avšak, dôkaz o úlohe vírusovej replikázy v pohybe z bunky do bunky naznačuje, že procesy vírusovej replikácie a pohybu sú funkčne spojené (Hirashima a Watanabe, 2003; Knapp a kol., 2005; Knapp a kol., 2001).

Väčšina štúdií a pozorovaní zaoberajúcich sa intracelulárnym pohybom rastlinných vírusov poukazuje na spojenie pohybového proteínu tobamovírusov a mikrotubulami (Heinlein a kol., 1995; McLean a kol., 1995; Padgett a kol., 1996). V skutočnosti, pohybový proteín 30K sa silno viaže s mikrotubulami, a dokonca obsahuje motívy charakteristické pre tubulín (Boyko a kol., 2000). Nedávne práce naznačujú, že dynamika mikrotubulov v počiatočnej fáze infekcie môže riadiť pohyb MP proteínu, prípadne spojitosť vírusovej RNA s plazmodezmami (Boyko a kol., 2007; Brandner a kol., 2008; Ouko a kol., 2010; Sambade a kol., 2008). Lucas (2006), vo svojej práci popisuje, že vírusové častice majú tendenciu pretrvávajúť vo vnútri bunky ako modifikované plazmodezmy a zrelé, funkčné sítkovité floémy. Dokázal tiež, že rastlinné vírusy premiestňujú svoj genetický materiál medzi bunkami, v tzv. „encapsidovej“ forme, ktorá je chránená obalovým proteínom. Vo všeobecnosti, majú obalové proteíny funkciu ochrany vírusového genómu pred degradáciou počas ich replikácie v infikovanej rastline. V posledných desaťročiach bolo dokázané, že v závislosti od vírusu môže byť CP proteín zapojený takmer v každom kroku cyklu vírusovej infekcie, vrátane presunu vírusu do rastlinnej bunky, oddelenia vírusových častíc, prekladu vírusovej RNA, replikácie genómu, pohybu v rastline a aktivácie alebo potlačenia hostiteľskej obrany (Bol, 2008).

2.3.2 Životný cyklus Tobamovírusov

Replikácia Tobamovírusov prebieha v cytoplazme hostiteľskej bunky. Postupnosť krokov počas cyklu replikácie je nasledovná (Ishibashi a Ishikawa, 2016):

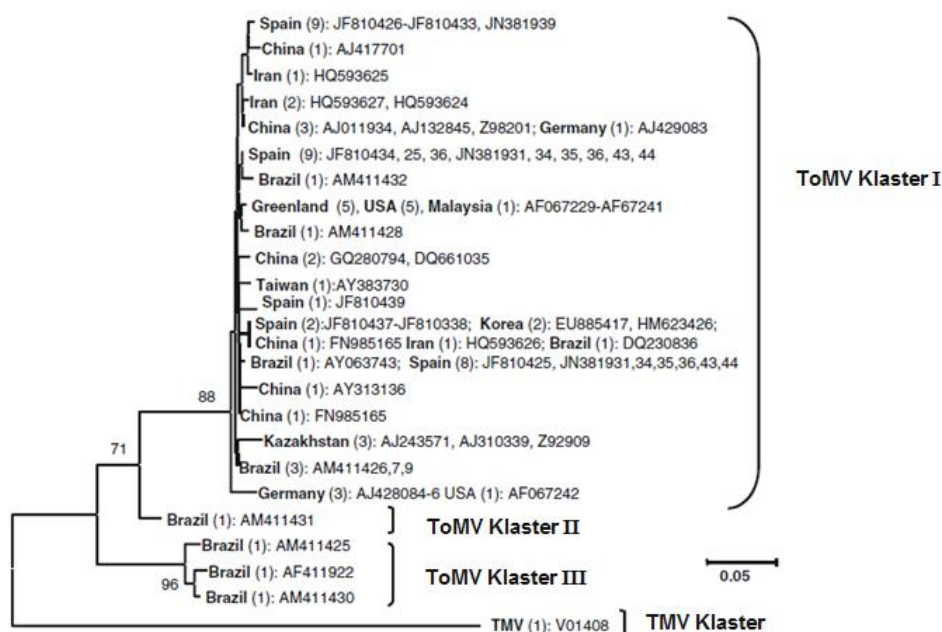
1. Penetrácia vírusu do hostiteľskej bunky.
2. Uvoľnenie vírusovej genómovej RNA do cytoplazmy hostiteľa.
3. Proces translácie vRNA v zmysle produkcie dvoch proteínov nevyhnutných pre ďalšiu syntézu RNA.
4. Samotná syntéza dvojvláknovej RNA podľa jednovláknového (+) vlákna RNA, slúžiaceho ako templát.
5. Syntéza novej genómovej RNA na základe (-) vlákna RNA ako templátu. Prebieha tiež syntéza subgenómových molekúl RNA, ktoré kódujú MP a CP proteíny.
6. Vytvorenie nových vírusových častíc.
7. Šírenie sa z bunky do bunky hostiteľa prostredníctvom plazmodeziem.
8. Mechanický prenos na ďalšieho hostiteľa.

2.4 Vírus mozaiky rajčiaka jedlého

Z taxonomického hľadiska sa zaraďuje do skupiny Tobamovírusov patriacich do rodiny *Virgaviridae*. To znamená, že vyššie uvedené charakteristiky genómovej a viriónovej štruktúry, ako aj replikácie Tobamovírusov sú charakteristické aj pre ToMV. Avšak počet nukleotidov je rozdielny, genóm ToMV obsahuje 6384 nukleotidov. Tento druh vírusu je vysoko infekčný, dosahuje vysoké

koncentrácie vo všetkých infikovaných tkanivách. Má tendenciu prežívať v rastlinných zvyškoch po dobu neurčitú. Jeho hostiteľský systém je veľmi široký, vrátane mnohých poľnohospodárskych plodín a burín, z ktorých všetky môžu slúžiť ako zdroj inokula (Bajet a kol., 2016). Patrí medzi ekonomicky dôležité vírusy, ktoré svojou infekciou spôsobujú mierne až závažné ročné straty (Chitra a kol., 1999). Jeho prirodzeným hostiteľom je rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum*), ďalej to môžu byť rastliny z čeľade ľuľkovitých (*Solanaceae*), kapustovitých (*Brassicaceae*), a mrlíkovitých (*Chenopodiaceae*) (Adkins a kol., 2003).

V roku 2011 sa Rangel a kol. vo svojej práci zaoberali analýzou genetickej štruktúry obalových proteínov ToMV vo vzťahu k jeho geografickému rozloženiu. Svetová populácia ToMV bola rozdelená do šiestich geografických podskupín: Európa (Španielsko a Nemecko), Južná Amerika (Brazília), východná Ázia (Čína, Kórea, Taiwan a Malajzia), Stredná Ázia (Kazachstan a Irán), Severná Amerika (USA) a Grónsko. Na základe prístupových čísel (dostupných z databázy GenBank) obalových proteínov ToMV bol pomocou programu CLUSTAL W vygenerovaný fylogenetický strom (Obrázok 3).



Obrázok 3: Fylogenetický strom 75 izolátov obalových proteínov vírusu mozaiky rajčiaka vrátane 1 izolátu vírusu mozaiky tabaku (TMV Klaster). Pri jednotlivých izolátach je zobrazený ich počet, miesto geografickej polohy a prístupové číslo dostupné v nukleotidovej databáze GenBank. Miera nukleotidovej diverzity je vyjadrená úsečkou o hodnote 0,05 čo zodpovedá 5 odlišným nukleotidom v úseku o počte 100 nukleotidov (Rangel a kol., 2011).

Analyzovaných bolo celkom 75 ToMV izolátov. Z toho bolo 29 izolátov získaných z papriek a paradajok pestovaných na rôznych poliach španielskej provincie (Almería, Barcelona, Leon, Murcia, Valencia, Vizcaya, and Zaragoza). Zvyšných 46 ekvivalentných sekvencií ToMV bolo izolovaných z rôznych plodín (rajčiak jedlý, paprika ročná, ľuľok baklažánový, orgován obyčajný, červený smrek) a z vodných zdrojov (jazerá a topiaci sa ľad). Výsledkom fylogenetической analýzy boli 3 klastre. Klastre II. a III. boli zložené z izolátov ToMV pochádzajúcich len z Brazílie, kde izoláty patriace do klastra I. pochádzali z Brazílie a zo zvyšných krajín sveta. Na základe genetickej podobnosti obalových proteínov bol teda ToMV rozdelený do troch rôznych genotypov. Skutočnosť, že rozdiel medzi nukleotidovými sekvenciami izolátov ToMV zo samotnej Brazílie ako aj zo zvyšných krajín sveta bol nízky, naznačuje že práve Južná Amerika resp. Brazília môže byť povodcom ToMV. Predpokladá sa, že genotyp ToMV s pôvodom Brazílie sa neskôr šíril do zvyšných krajín sveta (Rangel a kol., 2011).

2.4.1 Ochorenia spôsobené vírusom mozaiky rajčiaka jedlého

Príznaky ochorenia sú značne ovplyvnené teplotou, dĺžkou dňa, intenzitou svetla, vekom rastliny, intenzitou vírusu a kultivarom rajčiaka jedlého. Tieto typy príznakov môžu byť takto široko zoskupené (Bajet a kol., 2016):

- Listová škvrnitosť viditeľná ako svetlá a tmavšia zelená mozaika, niekedy s narušením mladších listov. Táto reakcia býva najčastejšie v lete, na rastlinách pestovaných v skleníkoch. V zimnom období, s nízkou intenzitou svetla a teplotou nižšou ako 20°C, sú rastliny často silne zakrpatené v niektorých prípadoch dochádza aj k malému „mramorovateniu“ (Obrázok 4). Rastliny sú menej životaschopné a výnos plodov klesá o 3 až 23%.
- Nekróza stonky, stopky listu alebo plodov. Na stonkách sa často vytvárajú tmavé pozdĺžne pruhy o rôznych dĺžkach. Plody môžu vykazovať nerovnomerné sfarbenie a nerovnomerné dozrievanie s vnútorným zhnednutím stien (Obrázok 5). Navyše, môžu na priereze oplodia obsahovať veľké, prepadnuté, nekrotické lézie (Obrázok 6).



Obrázok 4: Zakrpatené a poskrucané listy po infekcii vírusom mozaiky rajčiaka (Bajet a kol., 2016).



Obrázok 5: Porovnanie sfarbenia zdravého a infikovaného rajčiaka jedlého vírusom mozaiky rajčiaka (na pravo) (Bajet a kol., 2016).



Obrázok 6: Zhnednuté nekrotické lézie na priereze oplodia rajčiaka jedlého (Cerkauskas, 2005).

Infekcia ToMV, ktorá má za následok vyššie uvedené symptómy si vyžaduje čoraz väčšiu pozornosť. Mnoho výskumov zaoberajúcich sa touto problematikou stavia na včasnej detekcii ich prítomnosti a možností pretrvávania v podmienkach, ktoré im to umožňujú.

3. Diagnostické metódy

Pre detekciu a identifikáciu rastlinných patogénov môžu byť použité rôzne metódy, priame aj nepriame. Pri nepriamych metódach sa identifikácia konkrétneho vírusu uskutočňuje prostredníctvom nasledovných parametrov: morfologické zmeny, zmeny teploty, zmeny rýchlosti transpirácie a zachytávanie uvoľnených, prchavých a organických zlúčenín z napadnutých rastlín. Na druhej strane priama detekcia zahŕňa molekulárno - biologické metódy, ktoré môžu byť použité na vysoko selektívnu analýzu (high - throughput), kedy je potrebné analyzovať veľké množstvo vzoriek. V týchto metódach sú fytopatogény spôsobujúce ochorenia rastlín priamo detekované a poskytujú tak presnú identifikáciu choroby/patogénu (Fang a Ramasamy, 2015). Vyžadujú si komplexné vybavenie a niektoré z nich sú časovo náročné. Avšak intenzívne úsilie na mnohých miestach je na ceste k zlepšeniu a zjednodušeniu techník molekulárnej detekcie. Medzi metódy priame, sérologické, založené na báze protilátok patrí hlavne ELISA (Enzyme linked ImmunoSorbent assay). Ide o metódu relatívne jednoduchú, s čiastočnou automatizáciou a vhodnú pre testovanie vírusov v širokom meradle. Medzi metódy priame, založené na analýze nukleových kyselín, patrí najmä polymerázová reťazová reakcia (PCR). Túto skupinu metód tvoria navyše metódy založené na hybridizačných technikách (*Southern blotting*, *Northern blotting*) a sekvenačných technikách (Sekvenovanie podľa Sangera) (Sevík a Tohumcu, 2011).

3.1 Imunochemické metódy

Väčšina imunochemických detekčných systémov využívaných na identifikáciu vírusov, sú založené na vlastnostiach obalového proteínu vírusu. Obalový proteín (CP) vírusu môže obsahovať niekoľko epitopov, ktoré tvoria vymedzenú časť molekuly CP. Ide o oligopeptidové fragmenty zložené z aminokyselín (15 - 20), ktoré majú potenciál antigénových determinantov. Princíp imunochemických metód spočíva vo využívaní špecifických protilátok pripravených imunizáciou experimentálnych zvierat, ktoré reagujú na injektované antigény. Na vyvolanie imunitnej reakcie zvierat sa používajú epitopy s najvyšším koeficientom antigenicity (Goulter a Randles, 1997). El - Araby a kol. (2009); Sun a kol. (2001) opisujú vo svojej práci, že použitím špecifickej protilátky vyvinutej voči cieľovému vírusu je možné detekovať mnohé vírusy vrátane *Citrus tristeza virus* (CTV), Vírusu spôsobujúceho zvinutosť listov zemiaka, Vírusu zemiaka X a Vírusu zemiaka Y. Tieto testy sa na základe fázy delia na kvapalné a pevné. V prvom prípade oba antigény a protilátky reagujú v roztoku a tvoria tak viditeľnú zrazeninu (precipitínový alebo mikroprecipitínový test, gélové difúzne testy). V druhom prípade na pevnej fáze sú testy vykonávané na pevnom povrchu (mikrotitračná platnička alebo nitrocelulózová membrána), pričom reakcia antigén - protilátka je vizualizovaná pomocou vhodného detekčného systému ako je protilátka značená enzýmom. Väčšina rastlinných vírusov sa považuje za účinné antigény, ktoré pri umelom vstreknutí do vhodného stavovca (králik, myš), stimulujú produkciu špecifických protilátok (Lima a kol., 2012). Pri vývoji serologicko - diagnostických testov sa používajú dva typy protilátok t.j. polyklonálne a monoklonálne, ktoré sú pripravované podľa rôznych protokolov (Souiri a kol., 2014).

- Polyklonálne protilátky

Najčastejšou voľbou zvierat pre produkciu polyklonálnych protilátok sú práve králiky. Ľahko sa s nimi manipuluje, dobre reagujú na rastlinné vírusové antigény a produkujú dostatočné množstvo antiséra s vysokým titrom. Navyše, sú charakteristické svojím bohatým výberom sekundárnych „anti-rabbit IgG protilátok“ (Souiri a kol., 2014). Pri použití polyklonálnych protilátok zohrávajú dôležitú úlohu dva aspekty, ich kvalita a variabilita. V mnohých prípadoch tieto protilátky obsahujú kontaminujúce protilátky voči rastlinnému hostiteľovi. Výsledkom reakcie so zložkami hostiteľskej rastliny sú nešpecifické reakcie. Aby sa minimalizoval takýto typ reakcií, hostiteľské proteíny môžu

byť pre - adsorbované preinkubáciou antiséra s extraktom zo zdravej rastliny ešte pred použitím v teste ELISA. Druhým atribútom je variabilita medzi odlišnými druhmi antiséra a to v dôsledku antigénnych rozdielov v odozve medzi zvieratom (Naidu a Hughes, 2001). Štandardný protokol prípravy špecifického antiséra zahŕňa týždenné očkovanie s purifikovaným vírusovým izolátom. Po 4 - 6 týždňoch sú sérové frakcie krvi obsahujúce protilátky oddelené. Na imunizáciu králikov s rastlinnými vírusmi bolo použitých niekoľko postupov, vrátane intravenózne a intramuskulárnej injekcie. Predpokladá sa, že intravenózna cesta môže byť najlepším riešením pre malé imunogénne častice. Pretože sa šíria po celom tele, môžu byť ľahko vychytené lymfatickými bunkami. Polyklonálne antiséra sú nešpecifické a obsahujú protilátky proti všetkým dostupným epitopom na antigén. Táto možnosť je užitočná hlavne, ak povaha antigénu nie je známa a tak sa prejaví nižšou citlivosťou k zmenám v zložení antigénu. Avšak viacnásobná detekcia toho istého antigénu polyklonálnou protilátkou, vďaka tvorbe imunokomplexu protilátky s viacerými epitopmi toho istého antigénu, sa prejaví silnejším finálnym detekčným signálom (Souiri a kol., 2014).

- **Monoklonálne protilátky**

Monoklonálne protilátky sú imunoglobulíny odvodené z jedného klonu aktivovaných B - lymfocytov, resp. plazmatických buniek. Reagujú len s tým epitopom, voči ktorému boli vyrobené (Little a kol., 2000). Monoklonálne protilátky predstavujú pre sérológiu prevratnejšiu metódu než je metóda polyklonálnych protilátok. Ich základným princípom je, že antigény a to aj tie najjednoduchšie, ako sú vírusy, pôsobia na rôznych antigénnych miestach. Často stimulujú imunitné proliferácie v niekoľkých zvieracích klonoch produkovaním protilátky B lymfocytov, z ktorých každý zodpovedá konkrétnemu antigénnemu vzoru. A teda dochádza k zvýšeniu *in vitro* lymfocytých klonov metódou vytvárajúcou protilátky špecifické pre jeden antigénny vzor. Nevýhodou je, že *in vitro* proliferácia u B lymfocytov je časovo obmedzená. A preto by po zhromaždení kmeňových buniek B lymfocytov zo sleziny myší, ktoré boli dostatočne imunizované, malo dôjsť k zlúčeniu s nádorovými bunkami. Výsledkom je teda vytvorenie klonov, ktoré sú získané z jedinej bunky týchto "hybridómov". Takéto klony je možné skladovať pri nízkej teplote v kvapalnom dusíku alebo v proliferáčnom kultivačnom médiu, v ktorom dochádza k vypúšťaniu ich monoklonálnych protilátok. V procese výberu hybridomasy sa sérologické testy používajú na vyhľadanie klonu, ktorý má najväčšiu reaktivitu na antigén. Cieľom týchto testov je získanie protilátok (Souiri a kol., 2014).

Za jednoduchý a rýchly spôsob imunoanalýzy pre detekciu a kvantifikáciu imunoglobulínových proteínov v supernatante hybridomovej kultúry, kedy musí byť testovaný veľký počet vzoriek, sa považuje tzv. Dot immunobinding assay (Sulimenko a Dráber, 2004).

3.1.1 ELISA (Enzyme linked ImmunoSorbent assay)

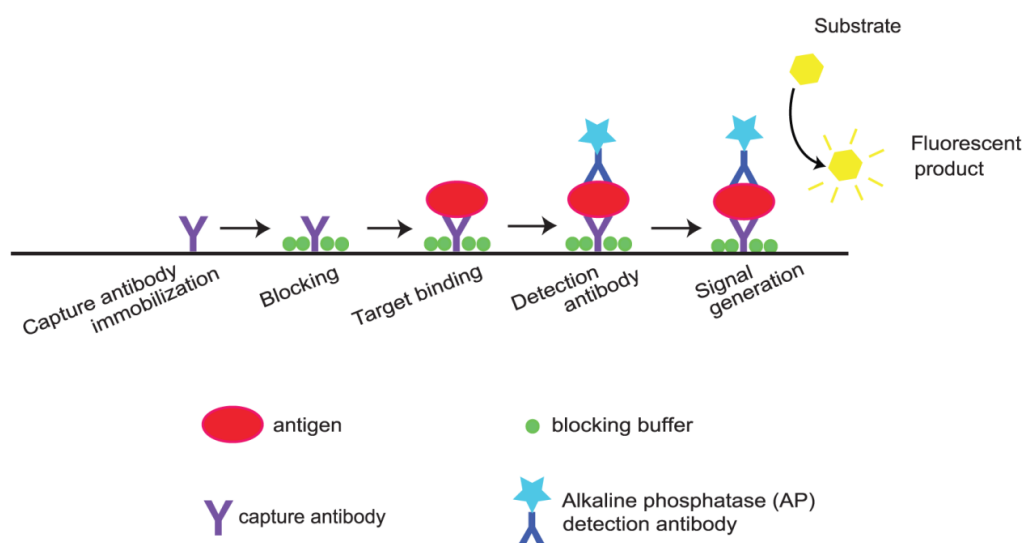
Prvotná publikácia súvisiaca s touto metódou bola uverejnená v roku 1977 (Clark a Adams). Predstavovala prelom vo vírusovej diagnostike a ohlasovala novú éru testovacích metód a technológií (Boonham a kol., 2014). ELISA je heterogénna imunoanalýza uskutočňovaná na pevnej fáze, zvyčajne v mikroplošných doskách tvorených buď polystyrénom alebo polyvinylchloridom. Má schopnosť detekovať vírusové častice vo veľmi nízkych koncentráciách. Vzhľadom k jej prispôsobivosti a vysokej citlivosti sa používa na indexovanie veľkých počtov vzoriek v relatívne krátkom časovom období (Naidu a Hughes, 2001). Avšak, tiež má niekoľko úskalí, ktoré obmedzujú jej použitie z hľadiska univerzálnosti. Po prvé, ELISA a jej rôzne typy si vyžadujú vysoko kvalitné antiséra, aby umožnili citlivé a špecifické väzby na vírusové antigény. Princíp tejto techniky je založený na interakcii antigénov vírusu s rozpoznateľnou špecifickou protilátkou (IgG), v súvislosti s kalorimetrickými vlastnosťami. Pri výrobe takéhoto antiséra je nutná čistota obalových proteínov resp. epitopov obalových proteínov. Napriek mnohým technologickým pokrokom, sa táto metóda stále považuje za nešpecifickú. V dôsledku toho sa ukutočňuje v špecializovaných laboratóriách. Nevýhody ELISY sú v ostrom kontraste k metódam založeným na analýze nukleových kyselín. Tie predstavujú menej náročné postupy založené na všeobecných molekulárnych princípoch, s čím súvisí aj nižšia nákladovosť procesu a vybavenosť laboratória. Po druhé, ELISA sa používa ako diagnostický nástroj na posúdenie fytosanitárneho stavu rastliny na účely karantény alebo certifikácie vírusu, ktorá je neoddeliteľnou súčasťou indexácie

patogénu. Z toho dôvodu je niekedy nutná diagnostika rôznych skupín patogénov (vírusových, bakteriálnych a hubových) v jednej plodine. Nevýhodou ELISY pri tomto type skrínungu je jej postrádateľnosť flexibility a kompatibility, ktorá je nevyhnutnou súčasťou niektorých molekulárnych metód. Po tretie, metóda ELISA síce detekuje vírusové antigény, no jej použitie nie je vhodné pri identifikácii špecifických vírusových druhov/kmeňov. Dôvodom je antisérum, ktorému chýba schopnosť rozlíšiť kmene vírusov, ktoré sú úzko spojené no majú zreteľný fenotyp. Deje sa tak častokrát preto, že kmeň určujúci znak sa neodráža v obalovom proteíne vírusu (napr. PVY patriaci do rodu *Potyvirus* a rodiny *Potyviridae*). Ďalšou príčinou môže byť vysoká konzervatívnosť CP proteínov v niektorých rodoch (napr. rod *Begomovirus*, rodina *Geminiviridae*) (Boonham a kol., 2014).

Na rozdiel od niektorých iných sérologických testov, princíp techniky ELISA pozostáva z detekcie antigén - protilátka, interakciou s enzýmom, ktorý indukuje farebnú reakciu. Aj keď boli vyvinuté rôzne varianty tejto metódy, priama a nepriama ELISA sa najčastejšie používajú pri diagnostike ochorení rastlinnými vírusmi. Medzi ďalšie modifikácie ELISA patria: Triple Antibody Sandwich (TAS - ELISA), Protein A - Sandwich (PAS - ELISA) a Immune Precipitation ELISA (IP - ELISA) (Lima a kol., 2012).

Priama ELISA

Vo svojej podstate využíva dve protilátky a preto sa označuje tiež ako „double antibody sandwich“ (DAS - ELISA). Je vysoko špecifická, čo zabezpečuje použitím detekčnej protilátky s naviazaným enzýmom (konjugátom). Typickým enzýmom je alkalická fosfatáza. Na základe použitého konjugátu, DAS - ELISA umožňuje detekciu a meranie koncentrácie antigénu vo vzorke. Prvým krokom pri uskutočnení tejto metódy je adsorpcia špecifickej protilátky daného vírusu na jamky mikroplošničky. Po inkubácii sa nenaviazané protilátky odstránia premývaním pomocou pufru. Následne sú pridané vzorky, ktoré majú byť testované vzhľadom na vírusový antigén. Ako pozitívne kontroly sa používajú výťažky zo známych napadnutých rastlín, na druhej strane ako negatívne kontroly výťažky zo zdravých rastlín. Tým sa zabezpečí nielen porovnanie hodnôt absorbancie, ale aj správna interpretácia výsledkov. Po inkubácii a premytí sa pridáva sekundárna protilátka konjugovaná s enzýmom. Tento komplex priamo reaguje s antigénom, ktorý je naviazaný na mikroplošničku. Mikroplošnička sa opäť premyje a pridá sa bezfarebný substrát (p -nitrofenylfosfát) (Obrázok 7). Pozitívna reakcia sa prejavuje žltým sfarbením, v dôsledku pôsobenia enzýmu (alkalická fosfatáza) na substrát. Negatívna reakcia sa preukazuje bezfarebne. Kolorimetrické zmeny sú merané v ELISA čítačke, s použitím filtra s vlnovou dĺžkou 405 nm (Lima a kol., 2012; Aydin, 2015).



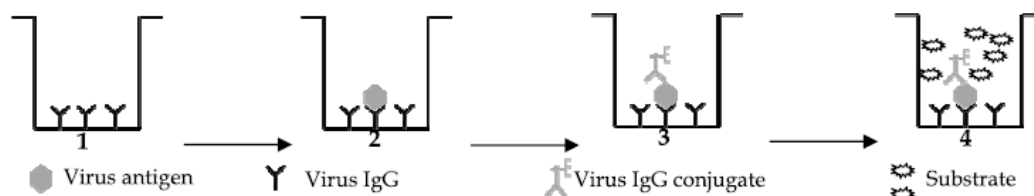
Obrázok 7: Schématické znázornenie princípu priamej metódy ELISA. Špecifická protilátka je naviazaná na steny mikroplošničky. Po inkubácii, ktorá prebieha buď 2 hodiny pri izbovej teplote,

alebo cez noc pri teplote 4 °C, sú nenaviazané protilátky premývaním s pufrom odstránené. Pridaním vzorky sa vytvára väzba medzi protilátkou a antigénom. Následne sa pridá druhá protilátka s naviazaným enzýmom (alkalická fosfatáza), ktorá sa viaže na antigén. Pridaním substrátu (p - nitrofenylfosfát) a jeho reakciou so špecifickým enzýmom naviazaným na protilátku dochádza k farebnej zmene reakcie (Thaitrong a kol., 2013).

Hoci má ELISA obmedzené použitie z hľadiska univerzálnosti, jej aplikácia našla uplatnenie aj pri diagnostike ToMV. V roku 2009 sa Silva a kol. vo svojom experimente zaoberali detekciou ToMV na semenách paradajok, ktoré boli umelo infikované. Extrakt použitý pri očkovaní zdravých semien paradajok pôvodne pochádzal z listov Tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum*) infikovaného ToMV. Získaním pozitívnych výsledkov z testu DAS - ELISA pre prítomnosť ToMV vírusu potvrdili svoje predpoklady o správne zvolenej serologickej metóde.

Nepriama ELISA

Iným názvom PTA - ELISA (Plate - trapped antigen). Táto technika bola vyvinutá v roku 1978 (Lindström a Wagner) a ich inšpirácia vychádzala z priamej metódy ELISA. Jej princíp spočíva vo využívaní neznačených primárnych protilátok, ktoré sú v interakcii so sekundárnymi, značenými protilátkami (Obrázok 8). Z toho dôvodu si PTA - ELISA vyžaduje produkciu protilátok v dvoch rôznych živočíšnych druhoch. Pre uskutočnenie testu nepriamej metódy ELISA je nutné použitie univerzálneho konjugátu IgG, ktorý môže byť použitý s protilátkami všetkých druhov rastlinných vírusov. Univerzálny konjugát resp. sekundárna protilátka rozpoznáva svojou Fab doménou všeobecnú Fc doménu primárnej protilátky, pričom má konjugovaný reportérový znak, najčastejšie enzým (peroxidáza, alkalická fosfatáza), alebo chemický marker (rádioaktívny izotop, fluorescenčnú látku). Pokiaľ sú protilátky proti vírusovým antigénom produkované u králikov, tak „anti - králičie“ protilátky IgG sú produkované v inom druhu zvierat (myši alebo kozy) (Lima a kol., 2012; Aydin, 2015).



Obrázok 8: Schématické znázornenie princípu nepriamej metódy ELISA. V prvom kroku dochádza k zachyteniu vírusového antigénu na mikrotlačítku. V druhom kroku, sa pridá neznačená protilátka (IgG), viaže s antigénom. V treťom kroku, sa pridá konjugát (značená, sekundárna protilátka získaná z iného živočíšneho druhu ako primárna protilátka), vytvára spojenie s neznačenou protilátkou. Za pomoci pridania substrátu a jeho interakcie s konjugátom dochádza k farebnej zmene (Lima a kol., 2012).

Praktické využitie nepriamej ELISA opisujú Oliveira a kol., (2000). Vo svojej práci demonštrovali sérologickú odlišnosť medzi vírusmi patriacimi do rovnakého rodu *Potyvirus*. Pozorované boli rastlinné izoláty obsahujúce nasledovné typy vírusov: vírus spôsobujúci krúžkovitosť listov papáje (*Papaya ringspot virus*, PRSV - W) infikujúci vodné melóny, vírus mozaiky vodného melóna (*Watermelon mosaic virus*, WMV) a vírus žltej mozaiky cukety (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV). Skúmaním sa zistilo, že WMV a ZYMV predstavujú výraznú, vzájomnú podobnosť, no s istými rozdielmi. Práve tie sa stali záujmom pre detekciu pomocou metódy PTA - ELISA. Ich analýza prebehla vo vzťahu vzájomnej absorpcie s homologickými a heterologickými špecifickými antisérmi WMV a ZYMV.

Na základe postupu, v ktorom sú vírusové antigény aplikované na membrány, sa môžu metódy deliť do ďalších troch skupín. Súhrnne ich možno nazvať „imunoblotovacie“ techniky. Medzi ne patria nasledovné metódy:

3.2 Dot immunoblotting assay (DIBA)

Metóda veľmi podobná k ELISA. Základným rozdielom medzi DIBA a ELISA je využívanie membrány namiesto mikrotitračnej platničky, ktorá slúži na naniesenie rastlinného extraktu z diagnostického materiálu. Ďalšou odlišnosťou je aplikácia princípovo rozdielne fungujúcich substrátov. Pri ELISA sa využívajú substráty, ktoré podliehajú rozkladu v dôsledku pôsobenia konjugátu, čo sa navonok prejavuje ako farebná zmena. Na druhej strane DIBA využíva chromogénne substráty. Hydrolýza týchto substrátov má za následok vznik farebnej zrazeniny v reakčnom mieste na membráne. Chemoluminiscenčné substráty, ktoré emitujú svetlo, po hydrolýze môžu byť použité a detekované svetelným signálom s röntgenovým filmom ako rádioaktívne značené sondy (Naidu a Hughes, 2001).

3.3 Tissue immunoblotting assay (TIBA)

Predstavuje obdobnú metódu k predchádzajúcej blotovacej metóde DIBA. Je charakteristická svojou jednoduchosťou, nevyžaduje zložitú prípravu vzorky alebo extrakciu. Poskytuje informácie o distribúcii vírusov v rastlinných tkanivách. Jej princíp spočíva v nanosení malých častí infikovaného rastlinného materiálu (stonky, listy, korene, hlúzy) priamo na nylónovú membránu alebo papier z celulózy. Detekcia prebieha rovnako ako pri DIBA (Hu a kol., 1997; Lin a kol., 1990; Hsu a Lawson, 1991; Polston a kol., 1991).

Nevýhodami DIBA a TIBA sú možné nešpecifické interferencie komponentov s membránou, čím vznikajú falošné signály. Hlavný dôraz sa však kladie na ich citlivosť, jednoduchosť a relatívne krátku dobu, potrebnú k testovaniu veľkého počtu rastlinných vzoriek. Najväčšou výhodou je, že membrány obsahujúce testované vzorky môžu byť zaslané na ďalšie spracovanie v tej danej krajine resp. v inej krajine (Naidu a Hughes, 2001).

3.4 Western blot

Táto „blotovacia“ technika sa zvyčajne používa na charakterizáciu vírusových proteínov (CP), než na ich detekciu. Umožňuje teda identifikáciu špecifických proteínov zo zložitej zmesi proteínov extrahovaných z buniek infikovaných rastlín. Analýzou Western blottingu je možné stanoviť vlastnosti vírusového proteínu nielen na imunochemickej úrovni, ale aj molekulárnej úrovni. Práve preto je táto metóda presnejšia a viac využívannejšia oproti metódam DIBA a TIBA. Na jej uskutočnenie sú potrebné 3 základné kroky, pričom posledné dva sú založené na rovnakom princípe ako predchádzajúce opísané metódy. V prvom kroku dochádza k separácii vírusových proteínov v polyakrylamidovom gély, na základe molekulovej hmotnosti pomocou elektroforézy. V druhom kroku dochádza k prenosu separovaných proteínov na nitrocelulóзовú alebo nylónovú membránu. Tretí krok slúži na vizualizáciu cieľového proteínu pomocou primárnej a sekundárnej protilátky. Na zvýšenie citlivosti sa používajú rôzne systémy označovania protilátok, vrátane chemiluminiscenčných. Taktiež sa uplatňuje systém tzv. avidín - peroxidáza alebo avidín - fosfatáza, pri ktorom sa využíva biotín modifikujúci interakciu. Naviazaním avidínu na biotín, dochádza k vzniku avidín - biotínového mostíku, ktorý je schopný pripojiť peroxidázu/fosfatázu k interagujúcim látkam. Po pridaní vhodného substrátu dochádza k vizualizácii interakcie (Mahmood a Yang, 2012; Lima a kol., 2012).

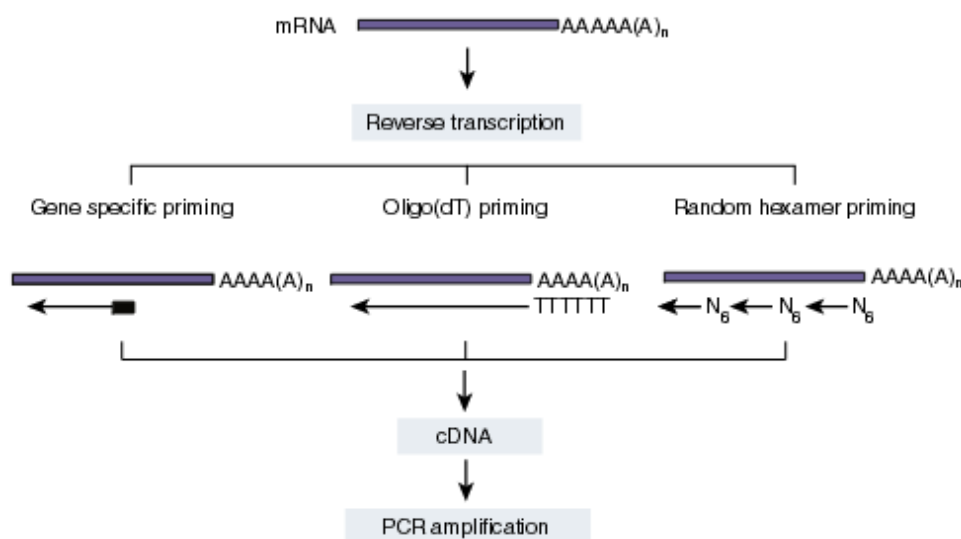
3.5 Metódy založené na analýze nukleových kyselín

Metódy založené na analýze nukleových kyselín sú charakteristické svojou citlivosťou, špecifickosťou a univerzálnosťou. Najčastejšie používané molekulárne techniky sú jednak molekulárna hybridizácia a potom polymerázová reťazová reakcia. V porovnaní s imunochemickými metódami, poskytujú niekoľko výhod (Lopez a kol., 2008). Nakoľko sú sérologické metódy založené na imunochemických vlastnostiach proteínov vírusu, ich analýzy sa nesústreďujú na celkový vírusový genóm. Existujú prípady, kde je aplikácia imunologických postupov obmedzená, napríklad pri detekcii viroidov a satelitných vírusových RNA. Na druhej strane molekulárne metódy umožňujú štúdium genetických vzťahov (Kumar, 2009). Nanajvýš umožňujú detekciu cieľovej molekuly v komplexnej

zmesi, zatiaľ čo pri sérologických testoch sú výsledky často nepresné. Dôsledkom je vznik falošných detekčných signálov. Charakterizácia vírusov na molekulárnej úrovni sa dosahuje detekciou z celkovej nukleovej kyseliny. Následne sa amplifikujú, buď úplné, alebo čiastočné genómové sekvencie pomocou PCR. PCR sa stala prednostnou technikou pre väčšinu aplikácií v oblasti rastlinných vírusov, pretože umožňuje detekciu vírusov vo veľmi nízkych titroch (Ndunguru a kol., 2005). Skutočnosť, že rôzne varianty PCR (hlavne RT - PCR) zvyšujú presnosť detekcie a diagnostiky, tým umožňuje rozšírenie vedomostí o ekológii a populačnú dynamiku mnohých rastlinných (Kumar, 2009).

3.5.1 Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase chain reaction)

Polymerázová reťazová reakcia je technika, ktorá sa stala základom všetkých diagnostických metód vzťahujúcich sa na detekciu rastlinných vírusov. Umožňuje amplifikáciu resp. tvorbu veľkého počtu identických kópií požadovanej sekvencie DNA v malej reakčnej skúmavke. Kľúčovým enzýmom pri syntéze vybranej sekvencie DNA je termostabilná DNA polymeráza. Pred samotným začiatkom PCR reakcie je dôležitý návrh dvoch sád oligonukleotidov (priamy a spätný primer), ktoré zabezpečujú ohraničenie vybraného úseku DNA. Počet naamplifikovaných cieľových sekvencií sa exponenciálne zvyšuje s počtom opakovaných fáz celého procesu PCR (Jeong a kol., 2014). Keďže väčšina rastlinných vírusov sú RNA vírusy je potrebné pri uskutočnení tejto metódy využiť enzým reverzná transkriptáza. V tomto prípade hovoríme o modifikácii PCR zvanej ako RT - PCR (reverzno - transkriptázová PCR) (Lopez a kol., 2008; Webster a kol., 2004). Úlohou reverznej transkriptázy (RNA - dependentnej DNA polymerázy) je prevedenie vyzolovanej vírusovej mRNA na komplementárnu DNA (cDNA). Pre syntézu cDNA sa používajú nešpecifické sekvencie primerov, kedy ide o zmes náhodných hexamérov alebo oligo - dT primerov. Známe sú aj špecifické sekvencie primerov, ktoré sú komplementárne k sekvencii daného génu (Obrázok 9). Náhodné hexaméry sú zmesov všetkých možných kombinácií šiestich nukleotidových sekvencií, ktoré možno pripojiť náhodne k mRNA. Najčastejšie sa pre iniciáciu syntézy cDNA využívajú oligo - dT primery, ktoré sú komplementárne k poly - A chvostu molekúl mRNA. Sekvenčne špecifické primery sú obmedzené, pretože sú navrhnuté tak, aby sa selektívne viazali na mRNA (Nikiforova a Nikiforov, 2011).

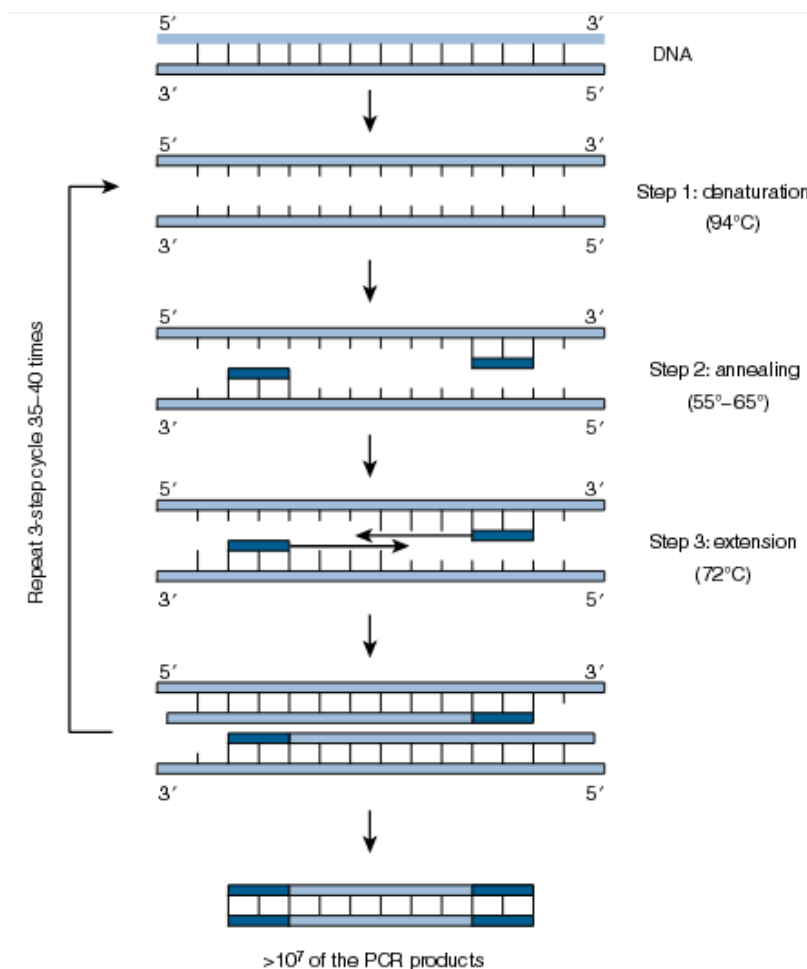


Obrázok 9: Schématické zobrazenie princípu reverznej transkripcie. Pri prevádzaní mRNA na cDNA, môžu byť použité buď nešpecifické primery: najčastejšie oligo - dT primery a náhodné hexaméry N₆, alebo genovo špecifické primery (Nikiforova a Nikiforov, 2011).

Vzniknutá cDNA v procese reverznej transkripcie môže byť použitá pre amplifikáciu v PCR rovnako ako iné molekuly DNA.

Nasledovná postupnosť krokov je v súlade s klasickou PCR a zahŕňa (Makkouk a Kumari, 2006; McCartney a kol., 2003) (Obrázok 10):

1. Denaturácia 2 - vlákovej DNA pri teplote 94°C, čím sa získa 1 - vláknová DNA. Komplementárne vlákna DNA sa rozpletajú v dôsledku zániku vodíkových (H - H) väzieb medzi nimi.
 2. Anelácia primerov za zníženia teploty na 55 - 65°C. Primery sa komplementárne viažu na obidve DNA vlákna.
 3. Elongácia za zvýšenia teploty na 72°C. V tomto kroku dochádza k syntéze obidvoch vlákien DNA v smere 5'→3'. Syntézu zabezpečuje DNA polymeráza z voľných deoxyribonukleozidtrifosfátov.
- Uvedné tri kroky sa môžu cyklicky opakovať prostredníctvom automatického zariadenia zvaného Termocykler. Výsledkom je veľký počet kopíí fragmentov DNA, ktoré boli ohraničené navrhnutými primermi (Lorenz, 2012).



Obrázok 10: Schématické znázornenie priebehu metódy PCR. V prvku kroku dochádza k denaturácii DNA (94°C). Následne nastáva proces anelácie (55 - 65°C), kde nadizajnované primery na základe komplementarity k DNA vláknu, ohraničia vybraný úsek DNA vlákna. V poslednom kroku dochádza k syntéze cieľového úseku DNA (72°C) pomocou DNA polymerázy (Kumar, 2009). Celkový proces amplifikácie vybraného fragmentu DNA trvá 35 - 40 minút (Nikiforova a Nikiforov, 2011).

Súhrne možno vyjadriť, že pre správny priebeh PCR reakcie je nevyhnutná prítomnosť týchto zložiek v reakčnom prostredí (Rahman a kol., 2013):

- templátová DNA (cDNA)
- 2 sady oligonukleotidov
- termostabilná DNA - polymeráza
- deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTP-dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

- tlmivý roztok (Mg^{2+})

Zásadným krokom ešte pred samotným priebehom PCR je návrh primerov, pri ktorých je nutné dodržiavať nasledovné pravidlá (Kumar, 2009; Lorenz, 2012):

- Dĺžka v rozsahu 15 - 30 básových párov (bp).
- Obsah guaninových a cytozínových párov (G + C) by mal byť v rozsahu 40 - 60 %.
- Primery nesmú byť navzájom komplementárne, v dôsledku vzniku tzv. primer - diméry.
- Teplota topenia (T_m) oboch primerov by mala byť približne rovnaká, s maximálnym rozdielom $\leq 5^\circ C$.

Separácia vzniknutých amplikónov v procese PCR sa uskutočňuje prostredníctvom elektroforézy. Jednotlivé DNA fragmenty sú separované na základe ich relatívnej molekulovej veľkosti a veľkosti náboja. Elektroforetické zariadenie podľa zvoleného média možno rozdeliť na (Izzo a kol., 2006):

- Horizontálnu elektroforézu, ktorá ako nosné médium využíva agarózu.
- Vertikálnu elektroforézu, ktorá ako separačné médium využíva polyakrylamidový gél v prítomnosti dodecylsírany sodného (SDS - PAGE).

Vizualizácia produktov PCR sa môže realizovať dvoma spôsobmi (Garibyan a Avashia, 2013):

- Použitím chemických farbív. Najčastejšie sa používa interkalačné farbivo Ethidium bromid (EtBr).
- Označením primerov s fluorescenčnými farbivami. Medzi takéto farbivá patrí napríklad: 6-karboxy-fluoresceín (FAM) a hexachloro-6-karboxy-fluoresceín (HEX).

Technika RT - PCR má v praxi pre detekciu rastlinných patogénov, vďaka svojej vysokej citlivosti a spoľahlivosti, omnoho väčšie využitie ako imunochemické metódy. V roku 1993, Wylie a kol., použitím metódy RT - PCR identifikovali prítomnosť tobamovírusu (*Cucumber mosaic virus*) v infekčnom semene Lupiny úzkolistej.

Medzi ďalšie modifikácie PCR patria:

3.5.1.1 Real - time PCR

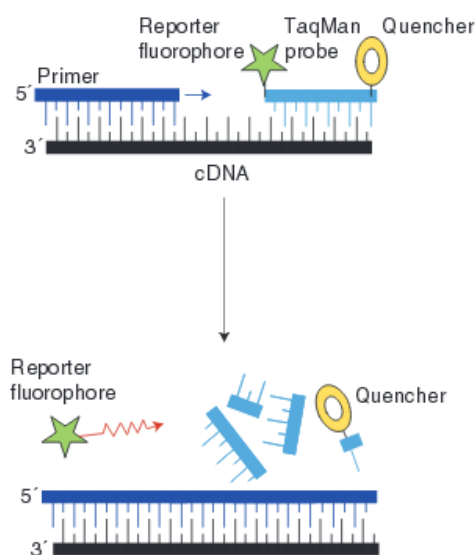
Metóda RT - PCR využíva hlavné princípy konvenčnej PCR, pričom detekuje a kvantifikuje produkty PCR v reálnom čase počas priebehu reakcie. (Nikiforova a Nikiforov, 2011; McCartney a kol., 2003; Ruiz - Ruiz a kol., 2009). Z toho dôvodu je možné ju využiť na dva typy analýz. Prvý typ poskytuje monitorovanie počtu naamplifikovaných kópií DNA fragmentov, kedy ide už o kvantitatívnu RT - PCR (qRT - PCR). Druhý typ zodpovedá vyššie uvedenej RT - PCR, čím umožňuje štúdium exprese génov po spojení s reverznou transkripciou. Výhodou PCR v reálnom čase je, že umožňuje skrining vírusových fytopatogénov aj pri nízkych koncentráciách. Navyše znižuje čas detekcie potrebný na diagnostiku vírusu, s čím súvisí aj menšie riziko kontaminácie (Lopez a kol., 2008).

qRT - PCR umožňuje meranie produktov vytvorených počas každého cyklu PCR procesu, ktoré sú priamo úmerné množstvu templátu pred začiatkom procesu PCR. Detekcia produktov sa uskutočňuje na základe troch princípov, ktoré využívajú (Ginzinger, 2002; Krypuy a kol., 2006; Lopez a kol., 2008):

- Nešpecifické fluorescenčné látky. V princípe ide o farbivá ako napríklad: SYBR Green I dye, SYTO 9, EvaGreen alebo LC Green, inkorporujúce sa do štruktúry DNA ako produktu PCR.
- Špecifické, fluorescenčne značené próby (TaqMan próby).
- Hairpin (vlásenkové) próby, ktoré sú charakteristické svojou priestorovou štruktúrou.

qRT - PCR založená na detekcii produktov pomocou špecifickej DNA TaqMan próby

Špecifické sekvenčné DNA próby využívané na detekciu DNA fragmentov v qRT - PCR, môžu byť rozdelené do dvoch skupín. K emisii fluorescence dochádza buď po hybridizácii próby s komplementárnou DNA sekvenciou alebo po hydrolýze próby. TaqMan próba využíva princíp detekcie založený na hydrolýze próby. Je charakteristická tým, že na 5' - konci obsahuje fluorescenčne značený reportér a na 3' - konci zhášač fluorescence. Ich vzájomná fyzická blízkosť výrazne ovplyvňuje fluorescenciu, tým že zhášač môže zabraňovať fluorescencii emitovanej reportérom. Emisia fluorescence nastáva v procese 5'→3' exonukleázovej aktivity DNA polymerázy, kedy dochádza k odštiepeniu reportéra z 5' - konca próby (Obrázok 11). Odštiepením reportérovej molekuly z príslušnej sondy v každom cykle qRT - PCR, pri ktorom sa proporcionálne zvyšuje aj množstvo amplikónov, vedie k zvýšeniu intenzity fluorescence. Následne dochádza ku kvantitatívnemu vyhodnoteniu (Heid a kol., 1996; Arya a kol., 2005).



Obrázok 11: Schématické zobrazenie qRT - PCR založenej na detekcii produktov pomocou TaqMan próby. Po denaturácii vlákna DNA v PCR reakcii dochádza ku anelácii primeru a špecifickej TaqMan próby na základe komplementarity. Po hybridizácii, dochádza k odstráneniu reportérovej molekuly z 5' - konca TaqMan próby pomocou 5'→3' exonukleázovej aktivity DNA polymerázy. Takto odstránená reportérová molekula umožňuje emisiu fluorescence (Arya a kol., 2005).

Špecificitu amplikónov qRT - PCR je možné dokázať na základe ich anelačnej teploty (T_m) a molekulárnej veľkosti produktu pomocou kontrolnej elektroforetickej separácie.

3.5.2 Hybridizácia nukleových kyselín

In situ hybridizácia (ISH), predstavuje súhrnný názov pre techniky, ktoré lokalizujú a detekujú génové transkripty v eukaryotických bunkách, pričom využívajú špecificky značené próby. Na detekciu sa využívajú, buď rádioaktívne (izotop fosforu ^{32}P) alebo nerádioaktívne (digoxigénové značenie, fluorescenčné, chromogénne) značené sondy. Na základe značených sônd majú tieto techniky aj svoje špecifické názvy, fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH), alebo chromogénna *in situ* hybridizácia (CISH) (Nozhat a Hedayati, 2015). Hybridizácia sa môže uskutočniť na úrovni DNA/DNA, RNA/RNA alebo kombinácii DNA/RNA. Využíva dve základne vlastnosti vlákna DNA alebo RNA a to schopnosť denaturovať a renaturovať. Princíp teda spočíva v hybridizácii (vzájomnom spojení sa) dvoch denaturovaných vlákien DNA/ RNA na základe komplementarity. Výsledkom je novo vzniknutá 2 - vláknová DNA/RNA, ktorá obsahuje jedno pôvodné, analyzované vlákno a druhé vlákno pridané počas hybridizačnej reakcie vo forme próby. Samotný proces hybridizácie sa uskutočňuje na

pevnom nosiči, membráne. Na základe detekcie cieľenej molekuly (nukleových kyselín) je možné molekulárnu hybridizáciu rozdeliť na (Barbu, 2007):

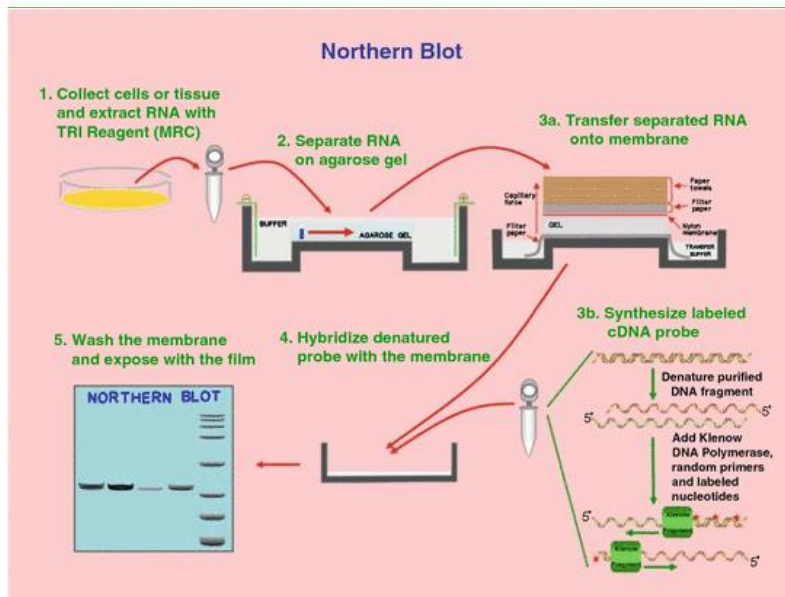
- Southern blotting, kde dochádza k identifikácii DNA sekvencií za použitia DNA alebo RNA sônd.
- Northern blotting, kde dochádza k identifikácii RNA sekvencií za použitia DNA alebo RNA sônd.
- Western blotting, kde dochádza k identifikácii proteínových sekvencií použitím špecifických protilátok.

Techniky ISH našli uplatnenie aj pri detekcii špecifických RNA a DNA sekvencií izolovaných z rastlinných vírusov a baktérií. Priestorová lokalizácia a vizualizácia vírusov a baktérií v priebehu infekčného procesu je zásadný krok, ktorý dopĺňa profil expresie v reakcii na rôzne podnety. Analýza časopriestorovej infekcie prostredníctvom techník ISH, dopĺňa molekulárno - biologické experimenty zamerané na pochopenie interakcií s bunkovými zložkami (Kliot a kol., 2014; Jensen, 2014).

Northern blotting

Z hľadiska genomickej štruktúry a samotného taxonomického zaradenia vírusu mozaiky rajčiaka ide o RNA vírus, preto sa pre jeho detekciu využíva Northern blotting. Metóda zahŕňa nasledovné kroky: (Obrázok 12) (Barbu, 2007; Streit a kol., 2009):

- Izolácia a extrakcia RNA. Pred samotnou extrakciou prebieha proces homogenizácie za pomoci komerčne dostupných činidiel (TRIzol). Extrakcia sa uskutočňuje pomocou koncentrovaného roztoku fenolu. Vyextrahovaná RNA sa oddelí (horná fáza) od spodnej fázy. Získaná zrazenina RNA sa premýva alkoholom.
- Elektroforetická separácia v prítomnosti agarozového gélu a elektroforetického pufru.
- Transfer, prenos separovaných molekúl RNA na pevný nosič (nitrocelulóзовý filter alebo nylónovú membránu). Kovalentným naviazaním na hybridizačnú membránu dochádza k presnému odtlačeniu separovaných fragmentov RNA v géli. Blotting môže byť buď kapilárny alebo vákuový. Na konci tohto kroku je veľmi dôležité zabezpečiť dobré naviazanie fragmentov RNA na pevnú maticu. To sa zabezpečuje najmä vystavením membrány proti UV žiareniu.
- Hybridizácia jednovláknových RNA fragmentov s komplementárnou rádioaktívne alebo nerádioaktívne značenou sondou. Najčastejšie využívanou sondou je rádioaktívne značená sonda, ktorá vzniká v procese tzv. „nick - translácie“. DNA polymeráza svojou 5'→3' exonukleázovou aktivitou najskôr odstraňuje nukleotidy a potom ich polymerázovou aktivitou zabudováva. Medzi nimi sa nachádza aj rádioaktívny značený (α -³²P - dNTP) nukleotid. Po jeho zabudovaní do reťazca vzniká rádioaktívne značená sonda.
- Odmývanie nehybridizovaných fragmentov značenej sondy z membrány. Chemické značenie sondy si vyžaduje inkubáciu membrány s vhodným reakčným činidlom alebo substrátom, ktorý má za následok emisiu svetla detekovateľnú príslušným detektorom. Röntgenové filmy získané z rádioaktívnej alebo chemiluminiscenčnej reakcie môžu byť potom ďalej analyzované počítačovým denzitometrickým softvérom. Ten vyhodnotí množstvo analyzovanej, kvantifikovanej RNA, ktorá je prítomná sa hybridizačnej membráne.



Obrázok 12: Schématické zobrazenie priebehu techniky Northern blotting. Po extrakcii RNA za pomoci činidla (TRIzol) dochádza k elektroferetickej separácii. Separované fragmenty RNA sa prenášajú na hybridizovanú membránu vo forme 1 vláknovej RNA. Následne dochádza k hybridizácii 1 - vláknovej pôvodnej RNA so značenou próbou. V poslednom kroku dochádza k premývaniu membrány od nehybridizovaných fragmentov a vizualizácii s vhodným detekčným zariadením (Wang a Yang, 2010).

In situ hybridizačné techniky sú v princípe podobné „blotovacím“ technikám (DIBA, TIBA), ktoré však na detekciu nepoužívajú značené próby, ale špecifické protilátky. Z toho dôvodu sú časovo náročnejšie a niektoré z nich sú obmedzené na prácu s modelovými organizmami.

4. Ciele práce

1. Porovnanie aminokyselinových sekvencií obalových proteínov jednotlivých dostupných patotypov ToMV.
2. Umelá infekcia ToMV patotypom (PV - 0135) charakteristickým pre naše klimatické pásmo.
3. Molekulárna charakterizácia obalového proteínu patotypu PV - 0135 ToMV vírusu a určenie antigenicity jednotlivých domén.
4. Optimalizácia riadenia polyklonálnej protilátky založená na detekcii zmesi synteticky pripravených epitopov Epi 1 + Epi 2.
5. Stanovenie prítomnosti CP ToMV PV - 0135 v infikovaných genotypoch (Salus, Niki, Oskar) prostredníctvom imunochemických analýz (DAS - ELISA, Western blotting).

5. Materiál a metódy

5.1 Chemikálie

5.1.1 Zloženie roztokov používaných pri umelej infekcii ToMV PV - 0135

1. Norit pufor s nasledovným zložením:

- 0,05M Na/K (PO₄)₃, pufor s pH 7.0
- 1mM kyselina etyléndiamíntetraoctová, 5mM DIECA,
- 5mM kyselina tioglykolová

2. Sterilná deionizovaná H₂O:

- 1 ml dietylpyrokarbonát (DEPC)
- 100 ml H₂O

Zloženie roztokov používaných pri izolácii proteínov z infikovaných odrôd rajčiaka jedlého

1. Pracovný roztok so zložením:

- 990 µl P - PER[®] Reagent A obsahujúci pufor na báze kyseliny 4 - (2-hydroxyetyl) -1 - piperazínetsulfónovej (HEPES), pH = 7
- 10 µl P - PER[®] Reagent B obsahujúci proteínový stabilizátor
- 750 µl P - PER[®] Reagent C obsahujúci organický extrakčný roztok

Zloženie roztokov používaných pri meraní koncentrácie proteínov pomocou PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo ScientificTM, USA)

1. BCA Reagent A (500 ml reagentu A) s obsahom:

- uhličitanu sodného, hydrogenuhlčitanu sodného, kyseliny bicinchonínovej a vínanu draselného v 0,1 M hydroxide sodnom)

2. BCA Reagent A (25 ml reagentu B) s obsahom:

- 4% síranu meďnatého

3. Skúmavky so štandardom albumínu (2 mg/ml) obsahujúce:

- hovädzí sérový albumín (BSA) vo fyziologickom roztoku a 0,05% azide sodnom - zásobný roztok

Zloženie roztokov používaných pri optimalizácii riadenia polyklonálnej protilátky a pri teste DAS - ELISA komerčnými protilátkami (Bioreba, DSMZ) a nami navrhnutou protilátkou

1. Riediaci pufor s nasledovným zložením:

- 50 mM Na₂CO₃
- 50 mM NaHCO₃
- 0,02 % NaN₃
- pH 9,6

2. PBS - Tween roztok s nasledovným zložením:

- 10 mM fosfátový tlmivý roztok (KH₂PO₄/Na₂HPO₄)
- 140 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 0,05 % Tween 20

3. Extrakčný pufo so zložením:

- 10 Mm fosfátový tlmivý roztok ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$)
- 140 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 0,05% Tween 20
- 2% PVP (polyvinylpyrrolidón)

4. Tlmivý roztok so zložením:

- 10 mM fosfátový tlmivý roztok ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$)
- 140 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 0,05% Tween 20
- 2% PVP
- 0,2% vajíčkový albumín (Sigma Aldrich - 5253)

Zloženie roztokov používaných pri separácii proteínových lyzátov pomocou SDS - PAGE a ich analýze metódou Western blotting

1. Zloženie a príprava nanášacieho pufru:

- 4 ml 10% SDS
- 1,2 ml 1 M Tris - HCl (pH 6,8)
- 1 ml 10% β - merkaptoetanol
- 0,002 g 0,02% bromfenolová modrá
- 2 ml 20% glycerol
- 1,8 ml dH_2O

2. Zloženie a príprava 12% separačného polyakrylamidového gélu

- 8,6 ml sterilná ddH_2O
- 6 ml 40% akrylamid
- 5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8)
- 200 μl 10% SDS
- 200 μl Persíran amónny (APS)
- 20 μl TEMED

3. Zloženie a príprava APS:

- 0,1 g persíranu amónneho
- 1 ml destilovanej H_2O

4. Zloženie a príprava 5% zahusťovacieho polyakrylamidového gélu

- 6,3 ml sterilná ddH_2O
- 1,25 ml 40% akrylamid
- 1,25 ml Tris (1,5 M, pH 8,8)
- 100 μl 10% SDS
- 100 μl Persíran amónny
- 10 μl TEMED

5. Zloženie a príprava 5x Running pufo na objem 1L

- 5 g 0,5% (w/v) SDS
- 15g 124 mM Tris
- 72 g 0,96 M glycínu

Pred použitím zriediť 1 x, t.j. 100 ml zarobeného running pufru a 400 ml ddH₂O

6. Zloženie transferového tlmivého roztoku

- 29,3 g 39 mM glycínu
- 58,2 g 48 mM Tris
- 0,04% SDS
- 20% metanol

7. Zloženie a príprava 10 x TBS-Tween (pH = 7,4)

- 87,6 g 1,5 M NaCl
- 12,12 g 100 mM Tris
- 5 ml 0,5 % (v/v) Tween 20

8. Zloženie a príprava blokovacieho reagentu (50 ml):

- 2,5 g 5% sušeného mlieka
- 48,75 ml roztoku 1x TBS-Tween
- 1,25 ml 2,5% inaktivovaného hovädzieho fetálneho séra (FBS)

5.2 Prístroje

ELISA reader (BioTek, EL x 800), Vortex (Labnet VX 100), Termoblok (digital dry baths, Labnet International, Inc), Electronic ultraviolet crosslinker, Centrifuga (Eppendorf centrifuge 5804/ 5804 R), Trepačka (Incubator Shaker series, New Brunswick™ Innova® 40, Innova® 40/40R), Stopky (Oregon scientific, eppendorf, Model No. TR 118), Mikrovlná rúra ETA 7203, Predvážky (Sartorius, BP 310S), homogenizátor (IKA T - 10), Hlbokomraziaci box (Innova® - 86°C Ultra-Low Temperature Laboratory Freezers), Automatické pipety s rôznymi objemami (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 0,1-2 µl, výrobca PZ HTL S.A), Zrkadlový fotoaparát (Canon EOS 600D), Elektroforetická aparátúra (Miniprotean 3 Cell, Complete System, BioRad, USA), Zdroj jednosmerného napätia (Consort Mini E132, Sigma Aldrich, USA).

5.3 Biologický materiál

Ako biologický materiál použitý na umelú infekciu odrôd rajčiaka jedlého (Salus - kríčkový, Niki - kolíkový, Oskar F1 - zvýšená odolnosť voči ToMV) bol použitý vírus mozaiky rajčiaka, patotyp PV 0135, ktorý je charakteristický pre naše klimatické pásmo. Izolát pochádzal zo zbierky Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganismis and Cell Cultures (Braunschweig, SRN). Klíčence odrôd rajčiaka jedlého, ktoré boli infikované ToMV PV - 0135 boli poskytnuté spoločnosťou Zelseed s.r.o (Horná Potôň).

6.1 Metódy a postupy

6.1.1 Príprava vírusového inokula ToMV PV - 0135 (DSMZ)

Do sterilnej trecej misky sme naliali malé množstvo kvapalného dusíka. Následne sme do dusíka vložili lyofilizované, vírusom ToMV PV - 0135, infikované listy. Po rozdrvení listovej biomasy na zelený prášok sme pridali Norit pufo v objeme 2 ml k 7,4 mg listov (c₁) a 1 ml k 6,0 mg listov (c₂). Vytvorené homogénne roztoky, v ktorých boli uvoľnené vírusové častice sme rozalíkvotovali pre nasledovné účely:

- na spektrofotometrické stanovenie koncentrácie celkovej proteínovej frakcie, za pomoci spektrofotometra NanoDrop,
- na umelú vírusovú infekciu odrôd rastlín rajčiaka jedlého,
- na stanovenie titru DAS - ELISA testom.

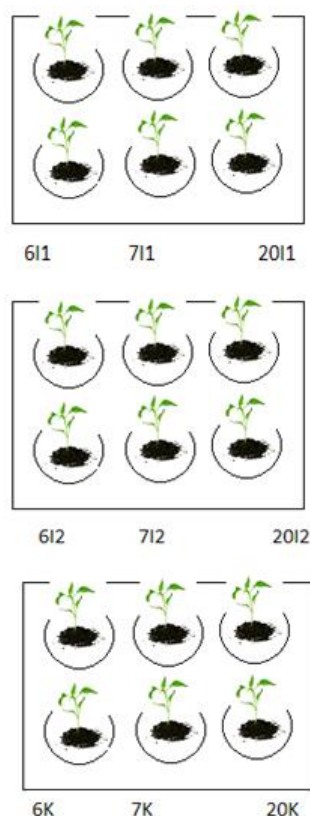
6.1.2 Kultivácia rastlinného materiálu

Rastlinné semená boli vysiate v klasických 12 cm plastových nádobách so substrátom, ktorý bol vopred vysterylizovaný v Mitcherlichových nádobách procesom autoklárovania. Rajčiaky jedlé boli najprv predpestované v skleníku a potom premiestnené do kontrolovaných podmienok rastovej komory. Kultivácia prebiehala pri nasledovných podmienkach:

- 16 hodín denný režim/ 8 hodín nočný režim,
- teplota: 24 - 25°C
- intenzita svetla: 152 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ FAR

6.1.3 Presádzanie a umiestnenie rastlín

Odrody rajčiaka jedlého boli presadené dňa 6. 2. 2017 do 3 L plastových nádob, pričom boli vo vývinovom štádiu plne vyvinutého druhého pravého listu (maximálne neúplne vyvinutého tretieho pravého listu). Následne boli rozmiestnené v piatich prepravkách podľa plánovaného použitia pripraveného vírusového inokula ToMV PV - 0135, ktorý mal byť aplikovaný pri umelej infekcii ($c_1 = I_1$, $c_2 = I_2$). Z každej testovanej odrody (6, 7, 20) boli v prepravke umiestnené 2 rastliny (Obrázok 13).



Obrázok 13: Schématické zobrazenie rozmiestenia odrôd rajčiaka jedlého s použitím vírusového inokula ($c_1 = I_1$, $c_2 = I_2$) na umelú infekciu.

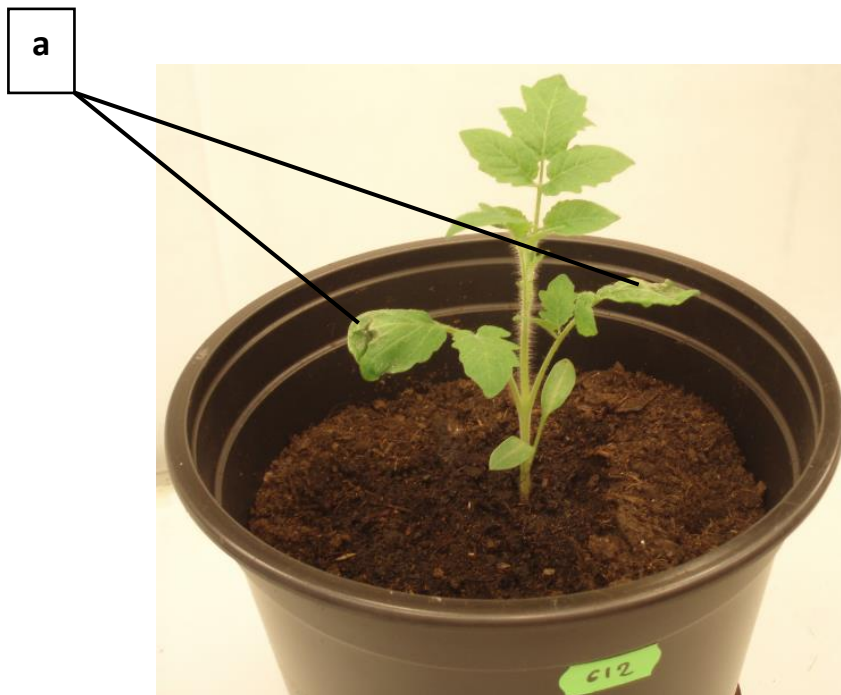
Legenda: 6, 7, 20 - čísla kódujúce odrodu rajčiaka jedlého, ktoré boli vysadené 9.1 a 10.1 2017; 6 - Salus (Zelseed) kríčkový; 7 - Niki Zel F₁ (Zelseed) kolíkový; 20 - Oskar F1 (Zeelseed), zvýšená odolnosť voči ToMV; I₁ - nižšia koncentrácia patogénu (resp. OD proteínovej frakcie); I₂ - vyššia koncentrácia patogénu (resp. OD proteínovej frakcie); K - kontrolné rastliny.

6.1.4 Postup umelej vírusovej infekcie

Kontrolné rastliny

Dva listy kontrolnej rastliny sme poprašili karborundom (zrניות 200 - 450, Sigma - Aldrich, USA) a naniesli po 20 μL Norit pufru na každý jeden z nich (celkovo 40 μL Norit pufru) (Obrázok 14).

Následne sme karborundum a Norit pufor zmyli sterilnou deionizovanou H_2O , aby sme zabránili možnému spáleniu listov pufrom. Rastliny sme nechali kultivovať po dobu 30 dní v optimálnych podmienkach, ktoré sú uvedené v kapitole Kultivácia rastlinného materiálu.



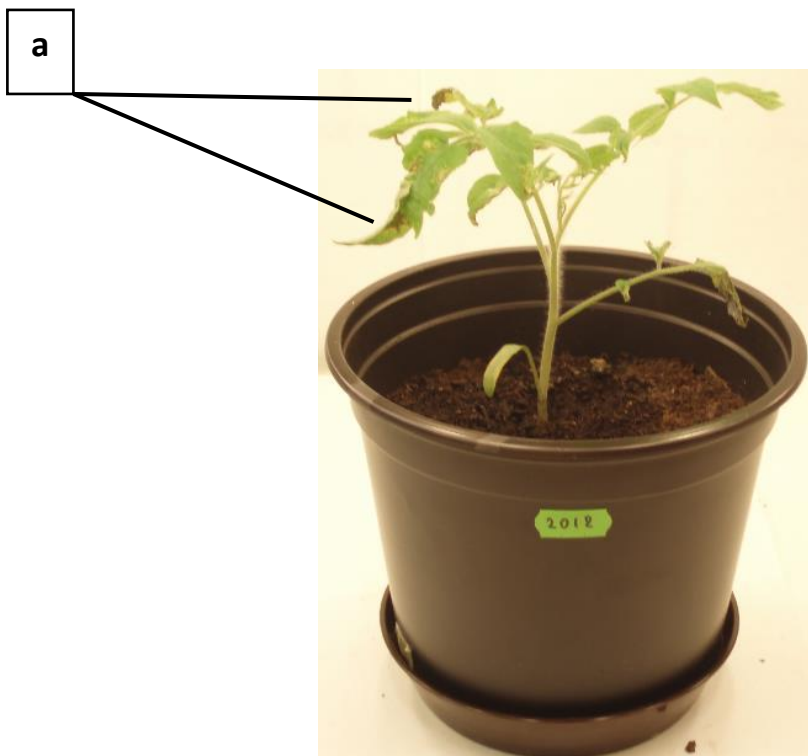
Obrázok 14: Aplikácia karborunda na listy, za účelom mechanického narušenia povrchových pletív.

Infikované rastliny

Infekcia (vírusom mozaiky rajčiaka jedlého, patotypu PV - 0135) na odrodách rajčiaka jedlého prebehla dňa 12.2.2017.

Infikovaných bolo 24 rastlín z 3 odrôd rajčiaka jedlého (6, 7, 20), t.j. : 2 x 6 I₁; 2 x 6 I₂; 2 x 7 I₁; 2 x 7 I₂; 2 x 20 I₁; 2 x 20 I₂.

Infekcia odrôd rajčiaka jedlého sa uskutočnila prostredníctvom dvoch pripravených koncentrácií vírusového inokula ($c_1 = I_1$, $c_2 = I_2$). Rovnako ako pri kontrolných rastlinách, sme obidva listy pochádzajúce z jednej rastliny poprášili karborundom. Aplikáciou karborunda sme mechanicky rozrušili povrchové pletivá listu, čím sme uľahčili penetráciu vírusu do vnútorných pletív. Na jeden list sme naniesli 20 μL vírusového inokula o požadovanej koncentrácii, na druhý list taktiež. Po 20 minútach sme rastliny opláchli sterilnou deionizovanou H_2O tak, aby sme zmyli prebytočné inokulum a karborundum. Po inokulácii sme infikované rastliny kultivovali v optimálnych podmienkach, ktoré sú uvedené vyššie. Počas kultivácie sme pravidelne sledovali a zaznamenávali charakteristické symptómy spôsobené infekciou vírusu mozaiky rajčiaka jedlého PV - 0135 (Obrázok 15).



Obrázok 15: Infikovaná odroda rajčiaka jedlého (20 I₂) po 6 dni infekcie vírusom mozaiky rajčiaka PV - 0135. Rastlina preukazovala charakteristické symptómy spôsobené umelou infekciou, t.j. listová škvrnitosť (a).

Plánované odbery materiálu:

Infikované odrody rajčiaka jedlého (6 I₁, 6 I₂, 7 I₁, 7 I₂, 20 I₁, 20 I₂) boli použité na tri odbery listovej biomasy:

- na izoláciu proteínov s následnou analýzou pomocou DAS - ELISA a Western Blotting.

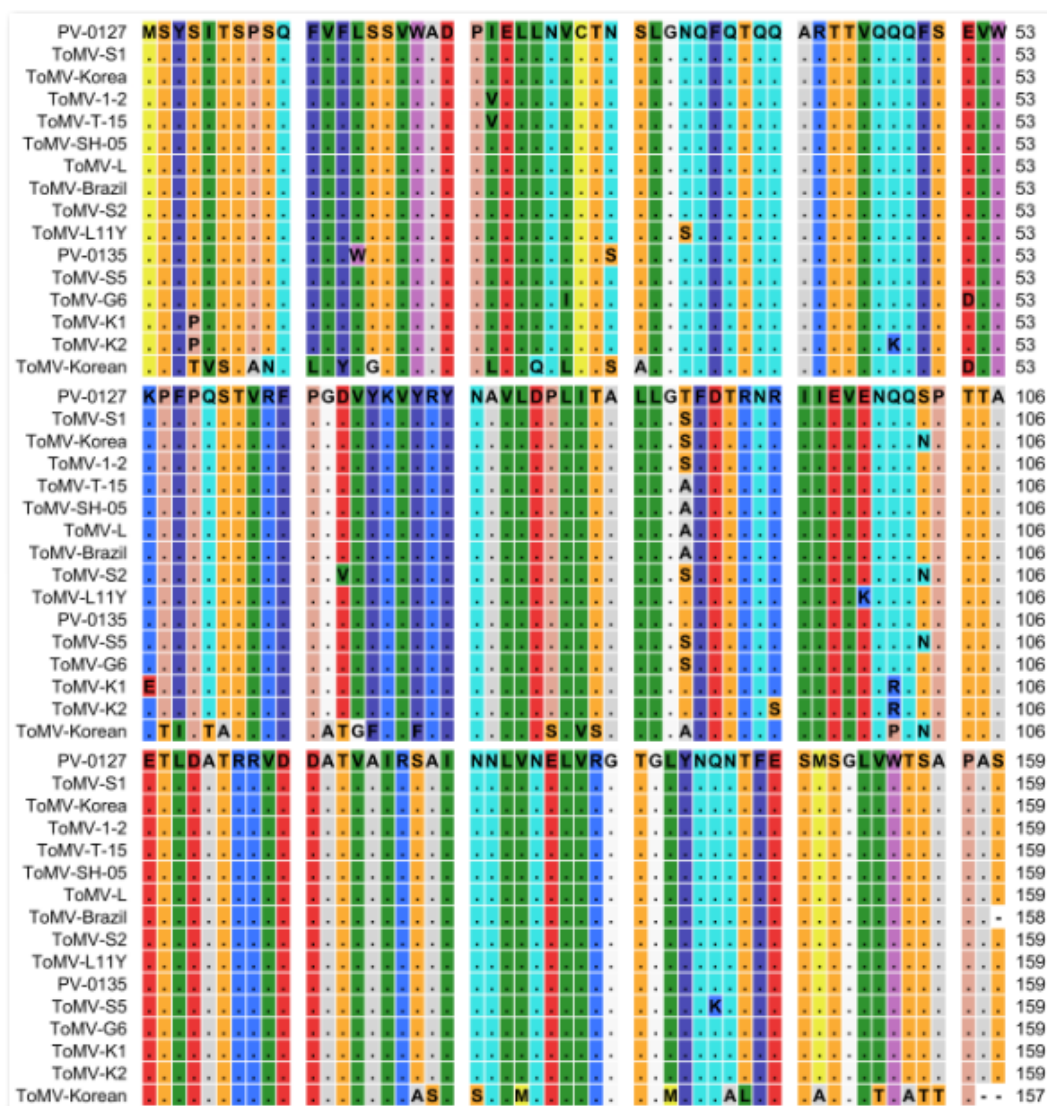
Kontrolné rastliny (2) z každej odrody (6K, 7K, 20K) boli použité na rovnaké účely ako infikované.

Odbery listovej biomasy sa uskutočnili po 2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 7 dní, 14 dní umelej infekcii.

Pre overenie správnej infekcie odrôd rajčiaka jedlého a diagnostiku prítomnosti ToMV PV - 0135 bola zvolená ako prvá analýza DAS - ELISA testom. Keďže ide o imunochemickú metódu založenú na detekcii obalového proteínu vírusu, bolo potrebné v prvom kroku navrhnuť vhodnú protilátku na tvorbu imunokomplexu.

6.1.5 Počítačová molekulárno - biologická analýza ToMV

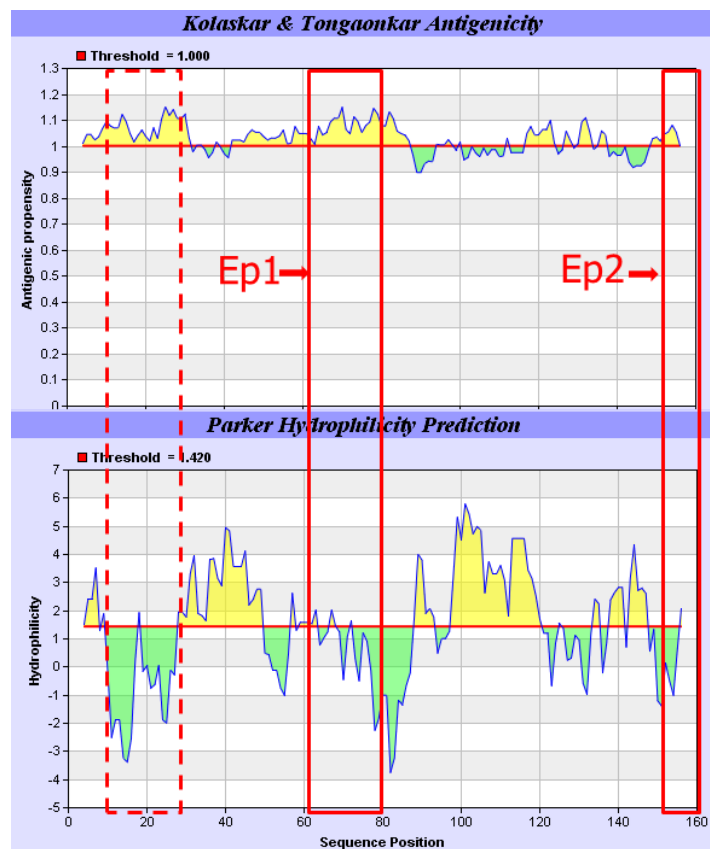
Na základe prístupového čísla obalového proteínu vírusu mozaiky rajčiaka PV - 0135 (AJ429084) sa v dostupných databázach GenBank a The UniProt Knowledgebase vyhľadali podobné CP patotypov k patotypu ToMV PV - 0135. Vybraných bolo 16 CP podobných patotypov s čo najvyššou homologickou podobnosťou. Získané sekvencie vo formáte FASTA boli uložené do textového dokumentu a následne nahrané do programu CLC Sequence Viewer 7.7.1, kde sa porovnali ich aminokyselinové sekvencie (Obrázok 16).



Obrázok 16: Porovnanie aminokyselinových sekvencií vybraných, homologicky podobných CP patotypov ToMV k patotypu ToMV PV - 0135.

Prostredníctvom softvéru CLC Main Workbench boli z aminokyselinových sekvencií patotypov ToMV, vyhodnotené oligopeptidové sekvencie vykazujúce antigenicitný potenciál. Najvhodnejší epitop sa pre tvorbu imunokomplexu dosiahne prienikom vlastností (Obrázok 17):

- špecifické zloženie aminokyselín (cysteín, leucín, valín) (Kolaskar a Tongaonkor., 1990)
- z hľadiska hydrofilicity pri ktorej platí, čím vyššia hydrofilicita, tým nižšia hydrofobicita (Parker a kol., 1986)

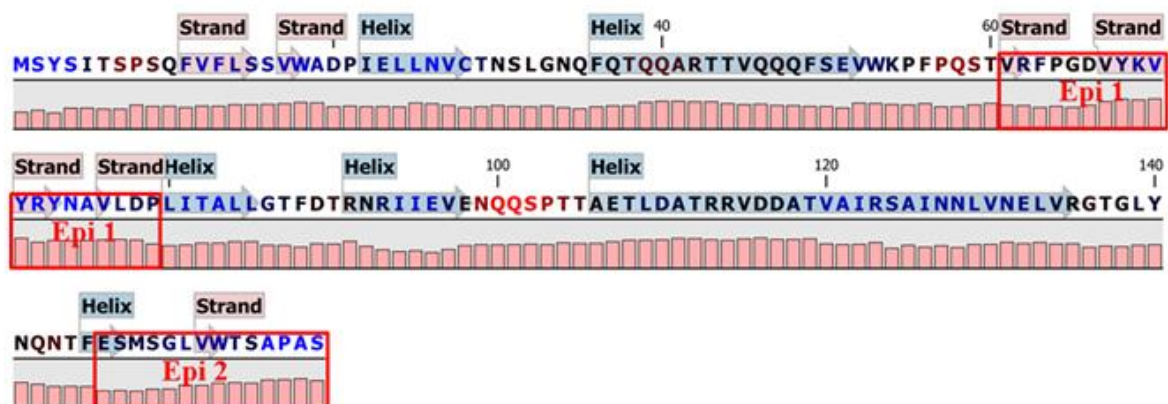


Obrázok 17: Schématické zobrazenie antigenicitného profilu s vyznačením navrhnutých epitopov, po prieniku vlastností hydrofilicity a špecifického zloženia aminokyselín.

Pre obalový proteín ToMV PV - 0135 boli navrhnuté tieto konkrétne oligopeptidy vykazujúce čo najvyšší koeficient antigenicity:

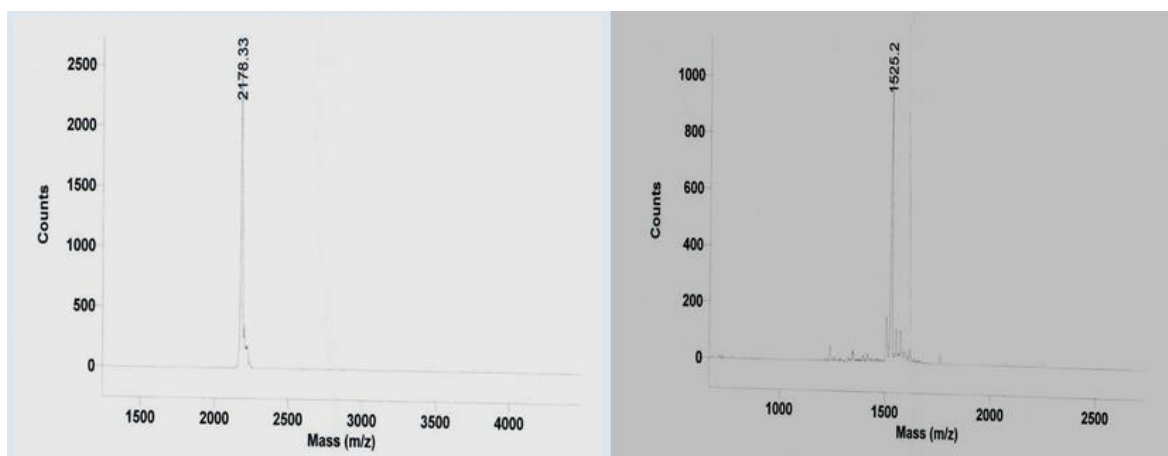
- Epi 1: NH₂ - RFPGDVYKVYRYNAVLD**C** - COOH
- Epi 2: NH₂ - **C**ESMSGLVWTSAPAS - COOH

Zloženie oligopeptidov vychádzalo z aminokyselinovej sekvencie ToMV PV - 0135 (Obrázok 18). Pre overenie správnosti navrhnutia oligopeptidov pred samotnou imunizáciou zvieratá (kráľika), boli odoslané komerčnej firme Metabion (Nemecko), ktorá ich modifikovala pridaním aminokyseliny cysteín, v zmysle zvýšenia imunochemickej odozvy kráľika.



Obrázok 18: Aminokyselinová sekvencia ToMV PV - 0135 s vyznačením navrhnutých epitopov (Epi 1, Epi 2) pomocou softvéru CLC Main Workbench.

Pre overenie kvality syntetizovaných epitopov (Epi 1 a Epi 2) bola realizovaná aj ich analýza prostredníctvom hmotnostnej spektrometrie s laserovou desorpciou a ionizáciou za účasti matrice s preletovým analyzátorom (MALDI - TOF MS) (Obrázok 19). Analýza bola opäť vykonaná komerčnou firmou Metabion.



Obrázok 19: Overenie kvality syntetizovaného epitopu 1 (vľavo), epitopu 2 (vpravo) prostredníctvom MALDI - TOF MS.

6.1.6 Imunizácia zvieratá

Imunizácia bola vykonaná na pracovisku určenom na prácu so živými pokusnými zvieratami. Jeho súčasťou boli aj vysoko sterilné podmienky pre prípravu protilátok. Pre uskutočnenie imunizácie králikov boli pracovisku zaslané navrhnuté oligopeptidy, pričom jej priebeh bol nasledovný:

- injektáž 3 mg epitopu (1.deň)
- injektáž 3 mg epitopu (21.deň)
- injektáž 3 mg epitopu (28.deň)
- injektáž 3 mg epitopu (35.deň)
- injektáž 3 mg epitopu (42.deň)
- injektáž 3 mg epitopu (49.deň)
- kvantitatívny odber krvi - separácia krvného séra
- konjugácia polyklonálnej protilátky s KLH (hemocyanin pochádzajúci z *Megathura crenulata*)

6.1.7 Optimalizácia riadenia polyklonálnej protilátky založená na detekcii zmesi synteticky pripravených epitopov Ep1 + Ep2

Pripravenú polyklonálnu protilátku sme nariesili riediacim pufrom v pomere 1:100, 1:300, 1:1000, 1:2500, 1:7500, 1:25000, 1:75000 v závislosti od koncentrácie protilátky. Na platničku (96 well Nunc Immuno Plates MaxiSorp f 96) sme nechali naviazať 200 μ l primárnej protilátky (v uvedených riedeniach) a inkubovali sme 4 hodiny pri 30°C. Vyklopením a zliatím sme odstránili roztok z jamiek. Nenaviazanú protilátku sme odstránili 2 x premytím jamiek roztokom 1 x PBS - Tween. Po vymytí jamiek sme naniesli zmes oligopeptidov (Epi 1 + Epi 2, t.j. 10 μ g z každého) nariesené na objem 200 μ l extrakčným pufrom. Mikroplatničku sme nechali inkubovať cez noc pri 4°C. Po inkubácii sme reakčnú zmes vyklopili a vymyli 3 x 200 μ l roztokom 1 x PBS - Tween (každú jamku). Následne sme pridali sekundárnu protilátku (Goat anti - Rabbit IgG (H + L), Secondary Antibody, AP conjugate (Pierce, katalógové číslo 31340). Riedenie sekundárnej protilátky sa pohybovalo v rozsahu 1:2 - 10000. Po zriedení sekundárnej protilátky tlmivým roztokom sme platničku nechali inkubovať 2 - 4 hodiny pri 37°C. Reakčnú zmes sme vyklopili a vymyli. Každú jamku sme premyli 3 x 200 μ l roztokom 1 x PBS - Tween. Reakciu sme zastavili pridaním 50 μ l 2 N NaOH do každej jamky. Zmerali sme absorbanciu pri 405 nm, špeciálnym spektrofotometrom tzv. ELISA readerom.

6.1.8 Izolácia proteínov z infikovaných odrôd rajčiaka jedlého

Celkové proteíny boli izolované z infikovaných a kontrolných odrôd rajčiaka jedlého, pomocou P- PER Plant Protein Extraction Kit (katalógové číslo 89803, Pierce, USA).

Do vopred vysterylizovanej, plastovej eppendorfovej skúmavky sme si pripravili pracovný roztok zmiešaním reagentu A (990 µl) a reagentu B (10 µl). Následne sme pridali reagent C (750 µl) a dostatočne sme roztok zvortexovali, kým sme nedosiahli koloidnú suspenziu. Z dôvodu zabránenia degradácie proteínov sme k reakčnej zmesi pridali inhibítory proteínáz, pričom sme roztok po celú dobu izolácie držali na ľade.

Odobratý, infikovaný list vybraných odrôd rajčiaka jedlého sme najprv namočili do tekutého dusíka. Keďže rastlinné bunky obsahujú pevné bunkové steny a vysoké množstvo vody, ich vymrazením kvapalným dusíkom sme získali homogenát, ktorý sme potom umiestnili do polypropylénového sáčku. Na mechanické rozdrvienie listu vo vnútri sáčku sme použili kladivko, ktoré sme jemne pritláčali na povrch vonkajšej strany sáčku. Pridali sme pracovný roztok tak, aby sme získali homogénnu zmes. Výslednú zmes obsahujúcu vírusové častice sme zo sáčku odpipetovali do vopred vysterylizovanej eppendorfovej skúmavky. Pre dosiahnutie rozdelenia organickej a vodnej fázy sme zmes centrifugovali 5 minút pri 5000 x g. Koncentráciu proteínov sme zmerali spektrofotometricky, pomocou BCA protein assay kit (katalógové číslo: 23225, Pierce, USA).

6.1.9 Meranie koncentrácie proteínov pomocou BCA protein assay kit

V prvom kroku bolo potrebné zriediť vzorky a pripraviť reagentie:

- BCA „working reagent“ (WR) - bolo pripravených 12000 µl (WR) zmiešaním 1176 µl BCA reagentu A a 24 µl BCA reagentu B v pomere (50 : 1).
- Vzorky proteínových lyzátov - bolo zriedených 20 vzoriek v pomere 1:9, t.j. 10 ml vzorky a 90 ml H₂O. Vzorky boli zriedené 10x.

Pre výpočet koncentrácií z nameraných absorbancií vzoriek (proteínové lyzáty), bol pripravený rad štandardov hovädzieho sérového albumínu (BSA). Štandardy s príslušnou koncentráciou boli pripravené podľa nasledujúcej Tabuľky 1.

Tabuľka 1: Príprava štandardov albumínu (BSA) pre stanovenie koncentrácie bielkovín z proteínových lyzátov.

Štandard	Objem destilovanej vody [µl]	Objem BSA [µl]	Výsledná koncentrácia BSA [µg/ml]
A	0	300 zásobného roztoku	2000
B	125	375 zásobného roztoku	1500
C	325	325 zásobného roztoku	1000
D	175	175 zo štandardu B	750
E	325	325 zo štandardu C	500
F	325	325 zo štandardu E	250
G	325	325 zo štandardu F	125
H	400	100 zo štandardu G	25
I	400	0	0

Pracovný postup:

- Do jednotlivých jamiek mikrotitračnej platničky bolo napipetovaných po 25 µl štandardov s príslušnou koncentráciou, vrátane nulového štandardu (blank) a nariadených vzoriek.
- Následne bolo do všetkých jamiek pridaných 200 µl WR.
- Mikrotitračná platnička bola premiešaná na trepačke (30 sekúnd) a inkubovaná 30 minút pri teplote 37° C.
- Po inkubácii a ochladení platničky na izbovú teplotu, bola zmeraná absorbancia štandardov a vzoriek pri vlnovej dĺžke 562 nm.

Získaním hodnôt absorbancií, boli z krivky lineárnej regresie vypočítané koncentrácie vzoriek, ktoré boli použité pri prepočte hmotností jednotlivých proteínových lyzátov. Vychádzali sme z hmotnosti 25 µg celkových proteínov na jamku.

6.1.10 Stanovenie prítomnosti kapsidového proteínu ToMV PV - 0135 pomocou imunodetekcie DAS - ELISA

A. Stanovenie prítomnosti ToMV PV - 0135 pomocou:

- komerčne dodanej protilátky (DAS - ELISA kit AS - 0104 against Tomato mosaic virus, Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Nemecko)
- komerčne dodanej protilátky (DAS - ELISA Tomato mosaic virus comple kit, katalógové číslo: 152 672, Bioreba AG (Švajčiarsko)

Zaslané protokoly na uskutočnenie DAS - ELISA testu pomocou komerčne dodaných protilátok boli v súlade s protokolom, ktorým sme postupovali aj pri optimalizácii riadenia polyklonálnej protilátky založenej na detekcii zmesi synteticky pripravených epitopov Epi 1 + Epi 2. Komerčné polyklonálne protilátky (Bioreba, DSMZ) sme nariadili v pomere 1:1000 podľa odporúčaní výrobcov. Hmotnosti pre jednotlivé vzorky boli vypočítané v kapitole Meranie koncentrácie proteínov pomocou BCA protein assay kit.

Zloženie vzoriek na mikropatničke bolo nasledovné (Tabuľka 2):

- N. K = negatívna kontrola - vírusové inokulum ToMV PV - 0135 (DSMZ) (S₁) zriedené pracovným roztokom (používaný pri izolácii proteínov z infikovaných odrôd rajčiaka jedlého), homogénne roztoky obsahujúce vírusové častice ToMV - PV 0135 (DSMZ) zriedené Norit pufrom v pomere 1:10 (S₂), 1:100 (S₃), proteínové lyzáty odobraté z kontrolných, neinfikovaných odrôd rajčiaka jedlého (6K, 7K, 20K).
- Vzorky = proteínové lyzáty odobraté (2h, 4h, 12h, 24h, 7 dní, 14 dní) po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého.
- Ab - Bioreba = antibody (komerčná protilátka od firmy Bioreba), riedenie 1:1000.
- Ab - DSMZ = antibody (komerčná protilátky od firmy DSMZ), riedenie 1:1000.

Tabuľka 2: Rozloženie vzoriek, negatívnych kontrol (ToMV PV - 0135 (S₁), S₂ (1:10), S₃ (1:100), 6K, 7K, 20K) a protilátok (Ab - Bioreba, Ab - DSMZ) na mikrotitračnej platničke počas testu DAS - ELISA.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
A	N. K.	ToMV PV 0135 koncentrát	ToMV PV 0135 konc.(1:10)	ToMV PV 0135 konc.(1:100)	6K	7K	20K	6c ₁ (2h)	20c ₁ (2h)	6c ₁ (4h)	20c ₁ (4h)	6c ₁ (12h)	Ab - Bioreba (1:1000)
B	20c ₁ (12h)	6c ₁ (24h)	20c ₁ (24h)	6c ₁ (7d)	6c ₂ (7d)	7c ₁ (7d)	7c ₂ (7d)	20c ₁ (7d)	20c ₂ (7d)	6c ₁ (14d)	6c ₂ (14d)	7c ₁ (14d)	
C	7c ₂ (14d)	20c ₁ (14d)	20c ₂ (14d)										
D	N. K.	ToMV PV 0135 koncentrát	ToMV PV 0135 konc.(1:10)	ToMV PV 0135 konc. (1:100) (S ₃)	6K	7K	20K	6c ₁ (2h)	20c ₁ (2h)	6c ₁ (4h)	20c ₁ (4h)	6c ₁ (12h)	Ab - DSMZ (1:1000)
E	20c ₁ (12h)	6c ₁ (24h)	20c ₁ (24h)	6c ₁ (7d)	6c ₂ (7d)	7c ₁ (7d)	7c ₂ (7d)	20c ₁ (7d)	20c ₂ (7d)	6c ₁ (14d)	6c ₂ (14d)	7c ₁ (14d)	
F	7c ₂ (14d)	20c ₁ (14d)	20c ₂ (14d)										

C. Stanovenie prítomnosti ToMV PV - 0135 nami navrhnutou protilátkou

Postupovalo sa štandardným postupom, ktorý bol realizovaný pri optimalizácii riadenia polyklonálnej protilátky založenej na detekcii zmesi synteticky pripravených epitopov Ep1 + Ep2. Protilátku sme riedili v pomere 1:100. Hmotnosti pre jednotlivé vzorky boli vypočítané v kapitole Meranie koncentrácie proteínov pomocou BCA protein assay kit.

Zloženie vzoriek na platničke bolo nasledovné (Tabuľka 5):

- N. K = negatívna kontrola - vírusové inokulum ToMV PV - 0135 (DSZM) (S_1) zriedené pracovným roztokom (používaný pri izolácii proteínov z infikovaných odrôd rajčiaka jedlého), homogénne roztoky obsahujúce vírusové častice ToMV PV - 0135 (DSZM) zriedené Norit pufrom v pomere 1:10 (S_2), 1:100 (S_3), proteínové lyzáty odobraté z kontrolných, neinfikovaných odrôd rajčiaka jedlého (6K, 7K, 20K).
- Vzorky = proteínové lyzáty odobraté (2h, 4h, 12h, 24h, 7 dní, 14 dní) po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého.
- Ab_1 = antibody 1 (protilátka 1), nepurifikovaná 1 (králik), riedenie 1:100.
- Ab_2 = antibody 2 (protilátka 2), nepurifikovaná 2 (králik), riedenie 1:100.
- Pep 1 = oligopeptid 1 (pozitívna kontrola), ktorým bolo imunizované zviera 1. Zásobný roztok 3 mg/ml (Tabuľka 3).
- Pep 2 = oligopeptid 2 (pozitívna kontrola), ktorým bolo imunizované zviera 2. Zásobný roztok 3 mg/ml (Tabuľka 4).

Tabuľka 3: Príprava štandardných roztokov pre oligopeptid 1 ako pozitívnych kontrol pri teste DAS - ELISA.

štandard	Pep 1-1	Pep 1-2	Pep 1-3	Pep 1-4	Pep 1-5	Pep 1-6
koncentrácia [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	30	3	0,3	0,1	0,03	0,003
10 μl na jamku mikroplatničky, zodpovedá x μg proteínu	300	30	3	1	0,3	0,03

Tabuľka 4: Príprava štandardných roztokov pre oligopeptid 2 ako pozitívnych kontrol pri teste DAS - ELISA.

štandard	Pep 2-1	Pep 2-2	Pep 2-3	Pep 2-4	Pep 2-5	Pep 2-6
koncentrácia [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	30	3	0,3	0,1	0,03	0,003
10 μl na jamku mikroplatničky, zodpovedá x μg proteínu	300	30	3	1	0,3	3

Tabuľka 5: Rozloženie vzoriek, pozitívnych kontrol (Pep 1, Pep 2), negatívnych kontrol (ToMV PV - 0135 (S_1), S_2 (1:10), S_3 (1:100), 6K, 7K, 20K) a protilátky (Ab_1 , Ab_2) na mikrotitračnej platničke počas testu DAS - ELISA.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
A	Pep 1-1	Pep 1-2	Pep 1-3	Pep 1-4	Pep 1-5	Pep 1-6	Pep 2-1	Pep 2-2	Pep 2-3	Pep 2-4	Pep 2-5	Pep 2-6	
B	N. K.	ToMV PV 0135 koncentrát (S1)	ToMV PV 0135 konc.(1:10) (S2)	ToMV PV 0135 konc.(1:100) (S3)	6K	7K	20K	6c ₁ (2h)	20c ₁ (2h)	6c ₁ (4h)	20c ₁ (4h)	6c ₁ (12h)	Ab ₁ (1:100)
C	20c ₁ (12h)	6c ₁ (24h)	20c ₁ (24h)	6c ₁ (7d)	6c ₂ (7d)	7c ₁ (7d)	7c ₂ (7d)	20c ₁ (7d)	20c ₂ (7d)	6c ₁ (14d)	6c ₂ (14d)	7c ₁ (14d)	
D	7c ₂ (14d)	20c ₁ (14d)	20c ₂ (14d)										
E	Pep 1-1	Pep 1-2	Pep 1-3	Pep 1-4	Pep 1-5	Pep 1-6	Pep 2-1	Pep 2-2	Pep 2-3	Pep 2-4	Pep 2-5	Pep 2-6	
F	N. K.	ToMV PV 0135 koncentrát (S ₁)	ToMV PV 0135 konc.(1:10) (S ₂)	ToMV PV 0135 konc.(1:100) (S ₃)	6K	7K	20K	6c ₁ (2h)	20c ₁ (2h)	6c ₁ (4h)	20c ₁ (4h)	6c ₁ (12h)	Ab ₂ (1:100)
G	20c ₁ (12h)	6c ₁ (24h)	20c ₁ (24h)	6c ₁ (7d)	6c ₂ (7d)	7c ₁ (7d)	7c ₂ (7d)	20c ₁ (7d)	20c ₂ (7d)	6c ₁ (14d)	6c ₂ (14d)	7c ₁ (14d)	
H	7c ₂ (14d)	20c ₁ (14d)	20c ₂ (14d)										

6.1.11 Postup Western blotting analýzy

Protokol separácie proteínových lyzátov pomocou SDS - PAGE s následnou analýzou Western blotting, bol realizovaný v súlade s postupom podľa Wan a kol, 2000; Mahmood a Yang, 2012. Na dôkaz prítomnosti obalového proteínu ToMV PV - 0135 bola ako primárna protilátka (anti coat protein ToMV) použitá protilátka Ab₁, navrhnutá na základe nami určených epitopov (Epi 1 + Epi 2).

Pracovný postup bol nasledovný:

- V prvom kroku bolo potrebné zostaviť si aparáturu na separáciu proteínových lyzátov.
- Vzorky odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar) s koncentráciou vírusového inokula c₁ a c₂ obsahujúce 50 µg celkových proteínov, sme denaturovali 5 minút pri 100°C vo vodnom kúpeli. Pred denaturáciou bolo potrebné ku každej vzorke pridať 5 x nanášací pufor o objeme 5 µl.
- Počas denaturácie vzoriek proteínových lyzátov sme si pripravili 12% separačný a 5% zahusťovací polyakrylamidový gél.
- Elektroforetickú aparáturu obsahujúcu separačný a zahusťovací gél sme zaliali 500 ml roztoku 1x Running pufor.
- Po prečistení jamiek od nespolymerizovaného polyakrylamidu sme vzorky proteínových lyzátov (20 µL) naniesli do zahusťovacieho 5 % gélu a separovali v 12% separačnom gély za použitia elektroforetického pufru (Laemmli, 1970).
- Ako marker molekulovej hmotnosti bol použitý PageRuler™ Plus prestained protein ladder (Fermentas, St. Leon - Rot, SRN) TB.
- Elektroforetické delenie prebiehalo 1 hodinu pri 100 V v aparátуре MiniProtein 3 Cell, Complete System (BioRad, USA). Ako zdroj jednosmerného napätia sme použili Consort Mini E132 (Sigma Aldrich, USA).
- Po SDS - PAGE, sme gél obsahujúci separované proteíny inkubovali 3x 5 minút v transferovom tlmivom roztoku.
- Na analýzu Western blotting sme ako transfer vyseparovaných proteínov v polyakrylamidovom gély použili nitrocelulózovú membránu (Amersham, USA), aparáturu Mini Trans - Blot Module (BioRad, USA) a zdroj jednosmerného napätia Consort Mini E132 (Sigma Aldrich, USA).
- Elektrotransfer prebiehal najprv 45 minút pri 250 mA, potom 15 minút pri 350 mA.
- Proteíny naviazané na nitrocelulózovej membráne sme premyli 3x po 2 minúty 1 x TBS-Tween pri izbovej teplote. Následne sme membránu inkubovali v 6 ml blokovacieho reagentu (60 minút, 37°C, 25 RPM).
- Membránu sme opäť jemne premyli v roztoku 1 x TBS - Tween.
- Premytú nitrocelulózovú membránu sme inkubovali v primárnej protilátke cez noc pri 4°C. Inkubácia prebiehala v 1/3 blokovacieho reagentu (3 ml); 2/3 1x TBS -Tween (6 ml) a 18 µl primárnej protilátky (Ab₁ riedená v pomere 1:500).

- Po inkubácii cez noc, sme membránu premyli v 1 x TBS -Tween a inkubovali v sekundárnej protilátke 2 hodiny na trepačke pri izbovej teplote. Inkubácia prebiehala v 1/3 blokovacieho reagentu (3 ml); 2/3 1x TBS-Tween (6 ml) a 3,6 µl sekundárnej protilátky (ECL rabbit IgG, HRP - Linked F (ab)₂ Fragment from donkey (Amersham, Piscataway, NJ, USA) riedená v pomere 1:2500).
- Po 2 hodinovej inkubácii sme membránu opäť premyli 3 x 1 minútu v TBS - Tween a následne vyfarbovali pomocou substrátu Pierce™ 1- Step Ultra TMB Blotting Solution.

6.1.12 Kvantifikácia výsledkov z analýz Western blot prostredníctvom programu Image Studio Lite

- Výsledky z analýz Western blot boli odfotené prostredníctvom digitálneho zrkadlového fotoaparátu (Canon EOS 600D) a nahraté vo forme JPG do programu Image Studio Lite.
- Pre lepšiu viditeľnosť jednotlivých bandov, bolo najprv potrebné upraviť kontrastné podmienky fotiek.
- Následne sme ručne, prostredníctvom „obdĺžnikov“ ohraničili bandy, ktoré zodpovedali rôznym časovým intervalom (2 h, 4 h 12 h, 24 h, 7 dní, 14 dní) odberov po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).
- Ohraničením miest záujmu (bandov) sme získali výsledky vo forme signálov, ktoré reprezentovali celkovú intenzitu bandov.
- Vygenerované signály pre jednotlivé bandy boli následne nahrané do programu Microsoft Excel, kde boli prepočítané na hodnoty relatívnych hustôt. Ako štandardy boli použité pozitívne kontroly, ktoré boli súčasťou Western blot analýz.
- Získaním hodnôt relatívnych hustôt, sme následne výsledky spracovali do podoby stĺpcových grafov. Predpokladali sme, že so zvyšujúcou sa dobou umelej infekcie budú narastať aj hodnoty relatívnych hustôt.

7 Výsledky a diskusia

7.1 Optimalizácia riadenia polyklonálnej protilátky založená na detekcii zmesi synteticky pripravených epitopov Ep1 + Ep2 v podmienkach „in vitro“

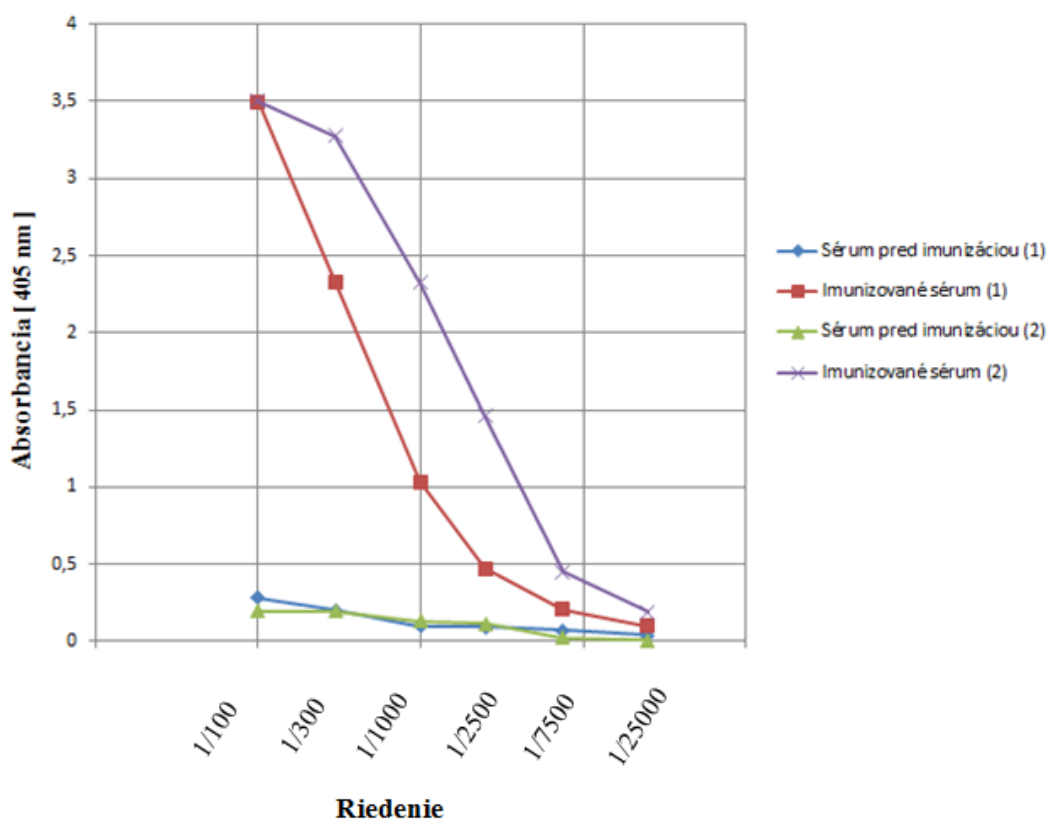
V prvej časti experimentálnej časti Diplomovej práce bola realizovaná kontrola navrhnutých epitopov DAS - ELISA testom (Tabuľka 6). Ako negatívna kontrola a miera špecificity protilátky slúžiaca na funkčnosť tvorby imunokomplexov so synteticky navrhnutými epitopmi bolo zvolené sérum pred imunizáciou, kde zviera (králik) nebolo ešte imunizované nami navrhnutými oligopeptidmi (Epi 1 a Epi 2). Zasláné séra (pred imunizáciou a po imunizácii) od firmy Metabion pochádzali z dvoch pokusných králikov (zvíra 1, zvíra 2). Imunizácia bola vykonaná na dvoch králikoch, a to z dôvodu zvýšenia efektivity výťažku polyklonálnej protilátky. Z tabuľky 6 možno pozorovať výsledky zaznamenané ELISA readerom pri vlnovej dĺžke 405 nm. Nanesené množstvá epitopov (Epi 1 a Epi 2) na jamku zodpovedali 10 µg každého z nich. Hodnoty absorbancií imunizovaného séra (aj pre zvíra 1 aj zvíra 2) nadobúdajú rádovo vyššie hodnoty oproti absorbanciám zaznamenaným zo sér pred imunizáciou. Z toho vyplýva, že imunizáciou králika špecificky nasyntetizovanými oligopeptidmi, sa podarilo vyprodukovať efektívnu polyklonálnu protilátku rozpoznávajúcu epitopy obalového proteínu ToMV PV - 0135. Týmto možno potvrdiť správnosť nami navrhnutých oligopeptidov, t.j.: Epi 1: NH₂ - RFPGDVYKVYRYNAVLDC - COOH, Epi 2: NH₂ - CESMSGLVWTSAPAS - COOH

Tabuľka 6: Hodnoty absorbancií zaznamenané ELISA readerom pri 405 nm s riedeniami (1:100, 1:300, 1:1000, 1:2500, 1:7500, 1:25000, 1:75000) sér pred imunizáciou a po imunizácii z dvoch pokusných králikov.

Riedenie krvného séra	Zvíra 1, sérum pred imunizáciou	Zvíra 1, imunizované sérum	Zvíra 2, sérum pred imunizáciou	Zvíra 2, imunizované sérum
1:100	0,281	3,500	0,199	3,500
1:100	0,281	3,498	0,197	3,500
1:100	0,279	3,495	0,195	3,498
1:300	0,199	2,328	0,195	3,275
1:300	0,200	2,330	0,194	3,270
1:300	0,200	2,327	0,193	3,275
1:1000	0,096	0,992	0,132	2,228
1:1000	0,100	1,077	0,130	2,415
1:1000	0,098	1,032	0,132	2,325
1:2500	0,095	0,470	0,114	1,462
1:2500	0,098	0,470	0,116	1,472
1:2500	0,096	0,472	0,118	1,450
1:7500	0,068	0,204	0,023	0,447
1:7500	0,070	0,205	0,024	0,450
1:7500	0,072	0,206	0,022	0,452

1:25000	0,039	0,099	0,008	0,193
1:25000	0,040	0,100	0,007	0,192
1:25000	0,037	0,102	0,008	0,190
1:75000	0,008	0,070	0,001	0,092
1:7500	0,007	0,068	0,001	0,092
1:7500	0,006	0,070	0,002	0,090

ELISA testom sme súčasne popri kontrole funkčnosti protilátky optimalizovali aj jej riedenie. Pripravenú protilátku sme riedili v pomere 1:100, 1:300, 1:1000, 1:2500, 1:7500, 1:25000, 1:75000. Ako najvhodnejšie riedenie sa preukázalo riedenie v pomere 1:1000 (Obrázok 20).



Obrázok 20: Graf závislosti absorbancií (zaznamenané ELISA readerom pri 405 nm) od riedení (1:100, 1:300, 1:1000, 1:2500, 1:7500, 1:25000, 1:75000) sér pred imunizáciou a po imunizácii z dvoch pokusných králikov.

Výber vhodného riedenia sme uvážili na základe výsledkov zobrazených v Tabuľke 6. Ďalším kritériom ovplyvňujúcim výber riedenia, bolo zachovanie optimálneho množstva protilátky vzťahnutého na jej počiatočný objem, ktorý sme mali k dispozícii.

7.3 Meranie koncentrácie proteínov pomocou BCA protein assay kit

Získaním hodnôt absorbancií nameraných pri vlnovej dĺžke 562 nm bol zostrojený graf závislosti absorbancií (os y) od koncentrácií (os x). Po vygenerovaní krivky lineárnej regresie boli vypočítané koncentrácie vzoriek (Tabuľka 7). Následne boli vypočítané objemy vzoriek, ktoré boli pridané do DAS - ELISA testu na jednotlivé jamky (uvažovalo sa 25 µg celkových proteínov na jamku).

Tabuľka 7: Výsledky hmotností vzoriek vzťahnutých na koncentrácie, ktoré boli prepočítané z absorbancií získaných pre každú vzorku pomocou testu DAS - ELISA.

Číslo	Vzorka	Čas po umelej infekcii	Absorbancia	Koncentrácia [µg/µL]	Množstvo vzorky na jamku [µg]
1	6 K	-	0,206	7,13	3,51
2	7 K	-	0,407	14,1	1,77
3	20 K	-	0,189	6,55	3,82
4	6 c ₁	2 h	0,033	1,14	21,93
5	20 c ₁	2 h	0,03	1,04	24,04
6	6 c ₁	4 h	0,027	0,94	26,6
7	20 c ₁	4 h	0,036	1,25	20
8	6 c ₁	12 h	0,032	1,11	22,52
9	20 c ₁	12 h	0,021	0,73	34,25
10	6 c ₁	24 h	0,039	1,35	18,52
11	20 c ₁	24 h	0,073	2,52	9,92
12	6 c ₁	7 dní	0,193	6,68	3,74
13	6 c ₂	7 dní	0,188	6,51	3,84
14	7 c ₁	7 dní	0,149	5,16	4,84
15	7 c ₂	7 dní	0,148	5,13	4,87
16	20 c ₁	7 dní	0,097	3,36	7,44
17	20 c ₂	7 dní	0,187	6,48	3,86
18	6 c ₁	14 dní	1,189	6,55	3,82
19	6 c ₂	14 dní	0,111	3,84	6,51
20	7 c ₁	14 dní	0,112	3,88	6,44
21	7 c ₂	14 dní	0,155	5,37	4,66
22	20 c ₁	14 dní	0,129	4,47	5,59
23	20 c ₂	14 dní	0,157	5,44	4,6
24	Inokulum ToMV PV - 0135	-	0,032	1,11	22,52

25	ToMV PV - 0135 koncentrát (S1)	-	0,037	1,28	19,53
----	--------------------------------	---	-------	------	-------

Po vypočítaní množstva daných vzoriek nasledovala analýza DAS - ELISA testom, kde sa testovala špecificita a miera detekcie medzi proteínovými lyzátmi a „našou“ protilátkou s doplnením o ďalšie dve, komerčne zakúpené protilátky (Bioreba, DSMZ).

7.4 Stanovenie prítomnosti kapsidového proteínu ToMV PV - 0135 komerčnými protilátkami (DSMZ, Bioreba) a „našou protilátkou“ pomocou imunodetekcie DAS - ELISA

Vyhodnotením výsledkov testu DAS - ELISA na stanovenie prítomnosti ToMV PV - 0135 nami navrhnutou protilátkou sme zistili, že riedenie „našej“ protilátky bolo nedostatočné. Pri DAS - ELISA teste boli použité tieto protilátky s daným riedením:

- Ab₁ (1:1000), Ab₂ (1:1000) - nepurifikované
- Ab₃ (1:1000), Ab₄ (1:1000) - purifikované cez CNBr - Sepharose column

Protilátky Ab₃ a Ab₄ (purifikované) nevykazovali dokonca žiadny signál. Hlavným faktorom, ktorý ovplyvnil priebeh testu boli špecifické väzby vytvorené medzi proteínovými lyzátmi a protilátkou, čo malo ďalej vplyv na prostredie. Na druhej strane aj samotné prostredie malo vplyv, a to konkrétne na konformáciu komplexu proteínov medzi ktorými sa nachádzal aj CP ToMV PV - 0135. Zmenou konformácie nedošlo k rozpoznaní CP ToMV PV - 0135 „našou“ protilátkou, čo sa preukázalo hodnotami, ktoré boli nemerateľné. Preto výsledky nie sú uvádzané. Keďže bola optimalizácia na riedenie polyklonálnej protilátky realizovaná za prítomnosti zmesi epitopov (Epi 1 a Epi 2), v tomto prípade prostredie nemalo bezprostredný vplyv na celkové výsledky. Rýchlosť rozpoznania epitopov danou protilátkou bola v tomto prípade rýchlejšia a presnejšia. Z dôvodu neúspešnej detekcie CP ToMV PV - 0135 protilátkou s riedením 1:1000 v zmesi proteínov nachádzajúcich sa v proteínových lyzátach sa experiment musel opäť zopakovať, pričom boli použité len nepurifikované protilátky (Ab₁ a Ab₂) s riedením 1:100 (Tabuľka 8).

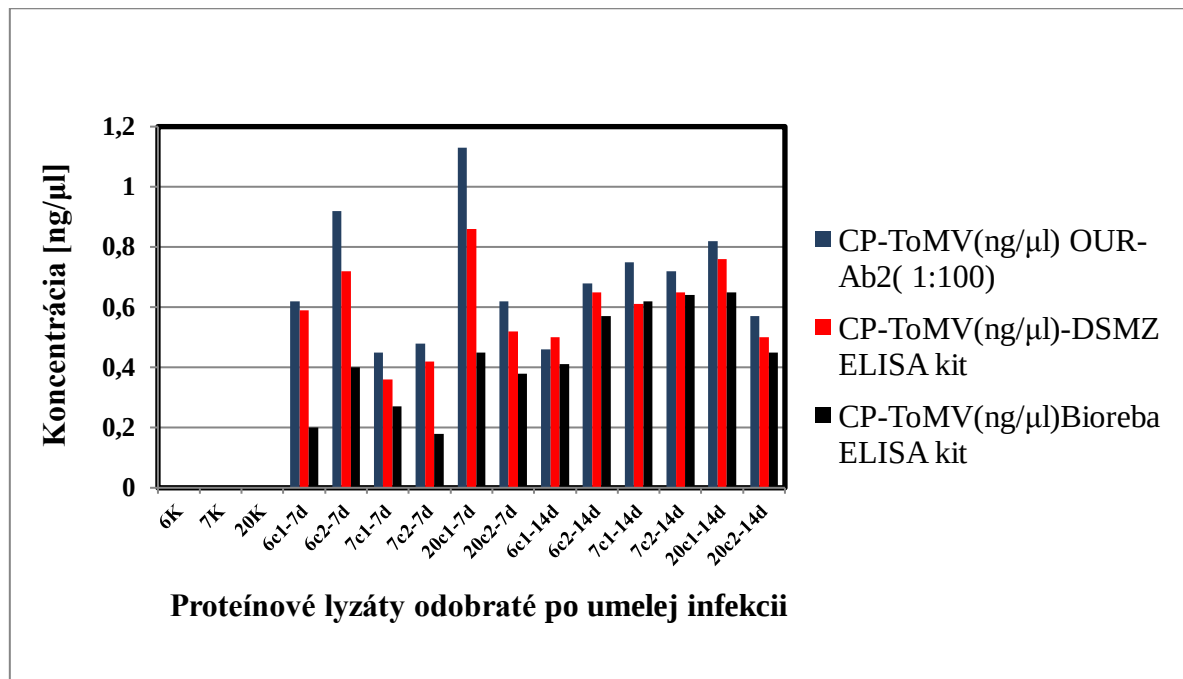
Tabuľka 8: Výsledky koncentrácií CP ToMV PV - 0135 po detekcii našimi protilátkami (Ab₁, Ab₂) a komerčnými protilátkami (Bioreba, DSMZ) získané testom DAS - ELISA.

Číslo	Vzorka	Čas po umelej infekcii	Koncentrácia [µg/µL]	Množstvo vzorky na jamku [µg]	Množstvo CP na jamku pre Ab ₁ [ng/µl]	Množstvo CP na jamku pre Ab ₂ [ng/µl]	Množstvo CP na jamku pre Bioreba [ng/µl]	Množstvo CP na jamku pre DSMZ [ng/µl]
1	6 K	-	7,13	3,51	0	0	0	0
2	7 K	-	14,1	1,77	0	0	0	0
3	20 K	-	6,55	3,82	0	0	0	0
4	6 c ₁	2 h	1,14	21,93	0	0	0	0
5	20 c ₁	2 h	1,04	24,04	0	0	0	0
6	6 c ₁	4 h	0,94	26,60	0	0	0	0
7	20 c ₁	4 h	1,25	20,00	0	0	0	0
8	6 c ₁	12 h	1,11	22,52	0	0	0	0
9	20 c ₁	12 h	0,73	34,25	0	0	0	0
10	6 c ₁	24 h	1,35	18,52	0,2	0,21	0	0
11	20 c ₁	24 h	2,52	9,92	0,5	0,22	0	0
12	6 c ₁	7 dní	6,68	3,74	0,17	0,62	0,2	0,59
13	6 c ₂	7 dní	6,51	3,84	0,25	0,92	0,4	0,72
14	7 c ₁	7 dní	5,16	4,84	0,22	0,45	0,27	0,36
15	7 c ₂	7 dní	5,13	4,87	0,25	0,48	0,18	0,42

Pokračovanie Tabuľky 8: Výsledky koncentrácií CP ToMV PV - 0135 po detekcii našimi protilátkami (Ab₁, Ab₂) a komerčnými protilátkami (Bioreba, DSMZ) získané testom DAS - ELISA.

Číslo	Vzorka	Čas po umelej infekcii	Koncentrácia [μg/μL]	Množstvo vzorky na jamku [μg]	Množstvo CP na jamku pre Ab ₁ [ng/μl]	Množstvo CP na jamku pre Ab ₂ [ng/μl]	Množstvo CP na jamku pre Bioreba [ng/μl]	Množstvo CP na jamku pre DSMZ [ng/μl]
16	20 c ₁	7 dní	3,36	7,44	0,6	1,13	0,45	0,86
17	20 c ₂	7 dní	6,48	3,86	0,65	0,62	0,38	0,52
18	6 c ₁	14 dní	6,55	3,82	0,58	0,46	0,41	0,5
19	6 c ₂	14 dní	3,84	6,51	0,77	0,68	0,57	0,65
20	7 c ₁	14 dní	3,88	6,44	0,6	0,75	0,62	0,61
21	7 c ₂	14 dní	5,37	4,66	0,65	0,72	0,64	0,65
22	20 c ₁	14 dní	4,47	5,59	0,58	0,82	0,65	0,76
23	20 c ₂	14 dní	5,44	4,60	0,58	0,57	0,45	0,5
24	Inokulum ToMV PV 0135	-	1,11	22,52	0,09	0,09	0	0
25	ToMV PV 0135 koncentrát (S1)	-	1,28	19,53	0,09	0,09	0	0

Z výsledkov (Tabuľka 8) možno pozorovať, že prvý signál zaznamenaný DAS - ELISA testom bol merateľný pri vzorke s koncentráciou c_1 (2 ml Norit pufru a 7,4 mg infikovanej listov biomasy) odobratej 24 hodín po umelej infekcii. Namerané množstvá obalových proteínov (0,2 ng/ μ l - Ab₁ a 0,21 ng/ μ l - Ab₂) prislúchali protilátkam, ktoré boli navrhnuté nami. Z toho možno usúdiť že „naša“ protilátka vykazovala vyššiu mieru detekcie oproti protilátkam komerčným (Bioreba, DSMZ), čo je graficky vyhodnotené na Obrázku 21.



Obrázok 21: Grafické zobrazenie vzoriek odobratých 2 h, 4 h 12 h, 24 h, 7 dní, 14 dní po umelej infekcii s prislúchajúcou koncentráciou ktorá bola stanovená pomocou testu DAS - ELISA.

Počas testu bola analyzovaná aj rýchlosť detekcie, ktorá bola nasledovná:

- Bioreba > DSMZ > Epi 1 > Epi 2

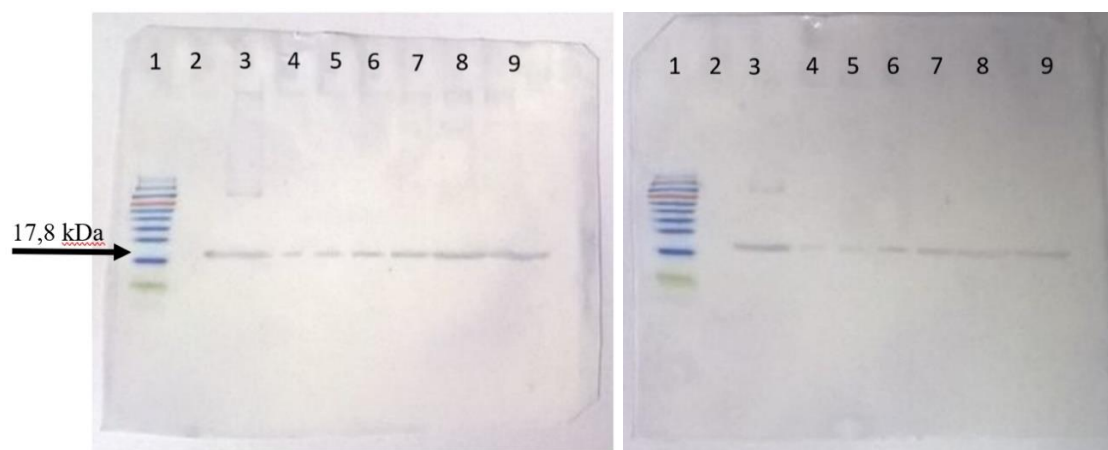
Hoci bola rýchlosť detekcie vyššia v prípade komerčných protilátok (Bioreba, DSMZ), na druhej strane je pravdepodobné, že miera špecificity oproti našim protilátkam bola nižšia. Tento fakt sme dokázali pomocou Western Blotting analýzy s našou protilátkou (Ab₁).

7.5 Stanovenie miery špecificity „našej“ protilátky na prítomnosť kapsidového proteínu ToMV PV - 0135 pomocou analýzy Western blot

Na overenie špecificity nami navrhnutej protilátky proti CP ToMV PV - 0135 na vybraných odrodách rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar) sme uskutočnili analýzu Western blot. V tomto prípade šlo o analýzu, kde dochádzalo k špecifickému rozpoznaní CP ToMV PV - 0135 „našou“ protilátkou. Miera detekcie bola určená špecifickosťou navrhnutej protilátky vychádzajúcej z konkrétne navrhnutých aminokyselinových sekvencií dvoch oligopeptidov (Epi 1 a Epi 2).

Zhodnotenie prítomnosti CP ToMV PV - 0135 možno určiť na dvoch úrovniach, a to kvalitatívnej a kvantitatívnej. Z kvalitatívneho hľadiska sme určili nielen prítomnosť CP ToMV PV - 0135 na nitrocelulózevej membráne, ale aj jeho molekulovú hmotnosť vyjadrenú v kDa. Kvalitu detekovaného CP ToMV PV - 0135 sme si overili aj prostredníctvom databázy UniProt, kde bola uvedená jeho veľkosť zodpovedajúca 17,8 kDa.

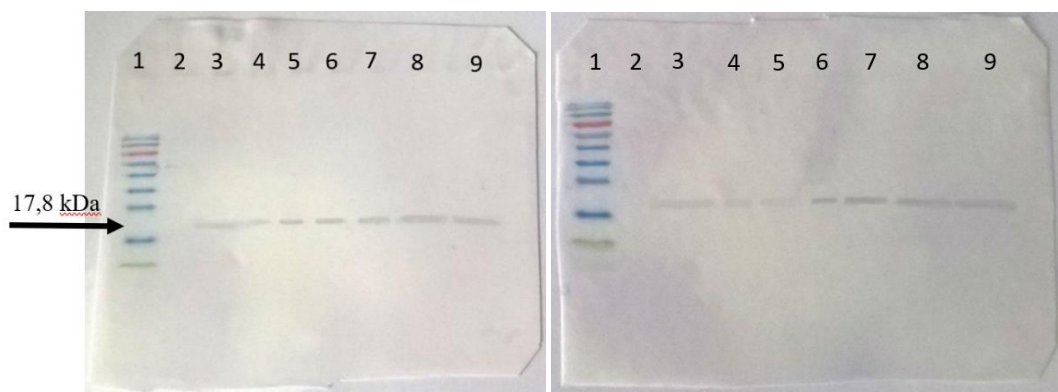
Experimentálnou realizáciou Western blot analýzy sme potvrdili predpoklad zistený pri nešpecifickej metóde DAS - ELISA. Kinetika komerčných protilátok (Bioreba, DSMZ) síce bola rýchlejšia, no nakoľko je „naša“ protilátka založená na špecifickom rozpoznávaní CP ToMV PV - 0135, bola jej kinetika pomalšia. Tento fakt sme usúdili z výsledkov zobrazených na Obrázkoch 22, 23 a 24.



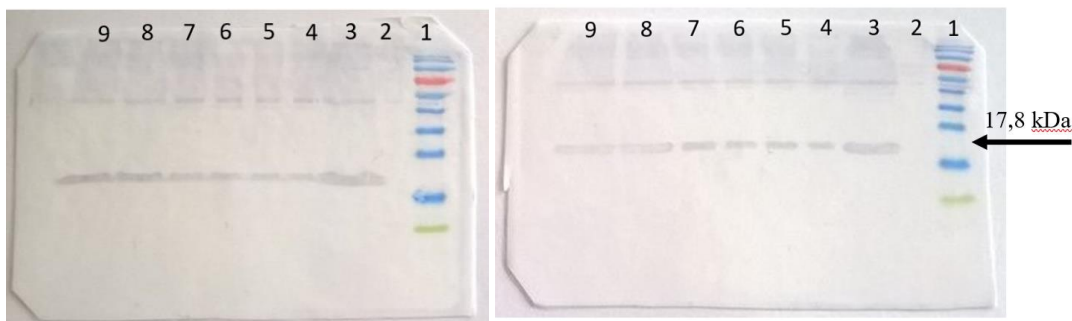
Obrázok 22: Western blot analýza na overenie špecificity „našej“ protilátky (Ab_1) proti CP ToMV PV - 0135 na kríčkovej (6 - Salus) odrode rajčiaka jedlého s použitím vírusového inokula (c_1 - vľavo, c_2 - vpravo).

Univerzálna legenda k Obrázkom 22, 23 a 24

1. štandard molekulovej hmotnosti (PageRuler™ Plus prestained protein ladder, Fermentas, St. Leon - Rot, SRN, TB).
2. N. K (negatívna kontrola) - proteínové lyzáty odobraté z kontrolných, neinfikovaných odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).
3. P. K (pozitívna kontrola) - vírusové inokulum ToMV PV - 0135 (DSZM) zriedené pracovným roztokom používaným pri izolácii proteínov z infikovaných odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).
4. Proteínový lyzát odobratý 2 h po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).
5. Proteínový lyzát odobratý 4 h po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).
6. Proteínový lyzát odobratý 12 h po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).
7. Proteínový lyzát odobratý 24 h po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).
8. Proteínový lyzát odobratý 7 dní po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).
9. Proteínový lyzát odobratý 14 dní po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého (Salus, Niki, Oskar).



Obrázok 23: Western blot analýza na overenie špecificity „našej“ protilátky (Ab_1) proti CP ToMV PV - 0135 na kolíkovej (7 - Niki) odrode rajčiaka jedlého s použitím vírusového inokula (c_1 - vľavo, c_2 - vpravo).



Obrázok 24: Western blot analýza na overenie špecificity „našej“ protilátky (Ab_1) proti CP ToMV PV - 0135 na odrode rajčiaka jedlého (20 - Oskar), ktorá je charakteristická zvýšenou odolnosťou voči ToMV, s použitím vírusového inokula (c_1 - vľavo, c_2 - vpravo).

Na Obrázkoch 22, 23 a 24 môžeme pozorovať bandy zodpovedajúce molekulovej hmotnosti CP ToMV PV - 0135. Transferom štandardu molekulovej hmotnosti (PageRuler™ Plus prestained protein ladder) na nitrocelulóзовú membránu sme potvrdili jeho molekulovú hmotnosť zodpovedajúcu 17,8 kDa. Z toho možno usúdiť, že „naša“ protilátka bola navrhnutá tak špecificky, že dokázala detekovať prítomnosť CP ToMV PV- 0135 v jeho skutočnej veľkosti, tak ako je uvádzaná aj databáze UniProt. Špecificitu protilátky možno potvrdiť aj z hľadiska detekcie CP ToMV PV - 0135 vztiahnutej na rôzne časové intervaly (2 h, 4 h 12 h, 24 h, 7 dní, 14 dní) odberov po umelej infekcii odrôd rajčiaka jedlého (6 - kričkový, 7 - kolíkový, 20 - zvýšená odolnosť voči ToMV). Prítomnosť CP ToMV PV - 0135 bola dokázaná už v ranných štádiách umelej infekcie (2 h), pričom bandy preukazovali jednoznačnú líniu (v oblasti 17 kDa) až po neskoršie štádia infekcie (7 dní) pri všetkých vzorkách odrôd rajčiaka jedlého. Porovnaním výsledkov z analýz DAS - ELISA testov, bola prvá detekcia „našou“ protilátkou zaznamenaná až po 24 h. Z hľadiska proteomickej úrovne je preto Western blot špecifickejšia metóda ako metóda DAS - ELISA.

Z teoretických úvah je zrejmé, že metódy založené na proteomickej úrovni (DAS - ELISA, Western blotting) umožňujú detekciu vírusov v neskorších fázach infekcie rastlín. Na druhej strane, metódy založené na transkriptomickkej úrovni (RT - PCR), umožňujú detekciu vírusov v rannom štádiu infekcie rastlín. Zaujímavým zistením je, že v našom prípade sme prostredníctvom Western blottu dokázali prítomnosť CP ToMV PV - 0135 už v rannom štádiu (2 h po umelej infekcii). Detekcia bola umožnená hlavne z dôvodu „našej“ špecificky navrhnutej protilátky. Dôležitým poznatkom súvisiacim s izoláciou umelo infikovaných proteínov vírusom ToMV PV - 0135 z rôznych častí rajčiakov jedlých (korene, listy) je, že vírus mozaiky rajčiaka, patotyp PV - 0135 je typ vírusu, ktorý svoje štádium latencie prechádza vo forme kompaktnej častice (viriónu) nachádzajúcej sa v cytoplazme. Existujú vírusy, ktoré sa prostredníctvom reverznej transkriptázy zabudovávajú do genómu hostiteľa vo forme DNA. Takýto typ vírusov by nebolo možné zdetekovať v rannom štádiu infekcie na úrovni proteínov. Li a kol. (2005) vo svojom článku uvádzajú výsledky analýzy Western blottu ako dôkaz prítomnosti CP ToMV v infikovaných rastlinách *Nicotiana benthamiana*. Vybraným biologickým materiálom bol patotyp vírusu ToMV s molekulovou hmotnosťou 16,8 kDa. Na detekciu bola použitá protilátka (anti - ToMV CP), ktorej konkrétne (špecifické) oligopeptidové zloženie autori v článku neuvádzajú. Analýza CP ToMV z hľadiska kvantity prebehla úspešne, avšak použitý CP ToMV zodpovedal proteínu, ktorý bol izolovaný 7 dní po umelej infekcii rastlín *Nicotiana benthamiana*. Porovnaním výsledkov s našou analýzou Western blot, ktorá zahŕňa detekciu obalových proteínov odobratých už po 2 hodinách umelej infekcie je možné zhodnotiť, že navrhnutie protilátky proti konkrétnym epitopom vykazujúcim, čo najvyšší antigenicitný potenciál, hrá kľúčovú úlohu pri samotnej kvalite, kvantite a čase detekcie proteínov po umelej infekcii rastlín.

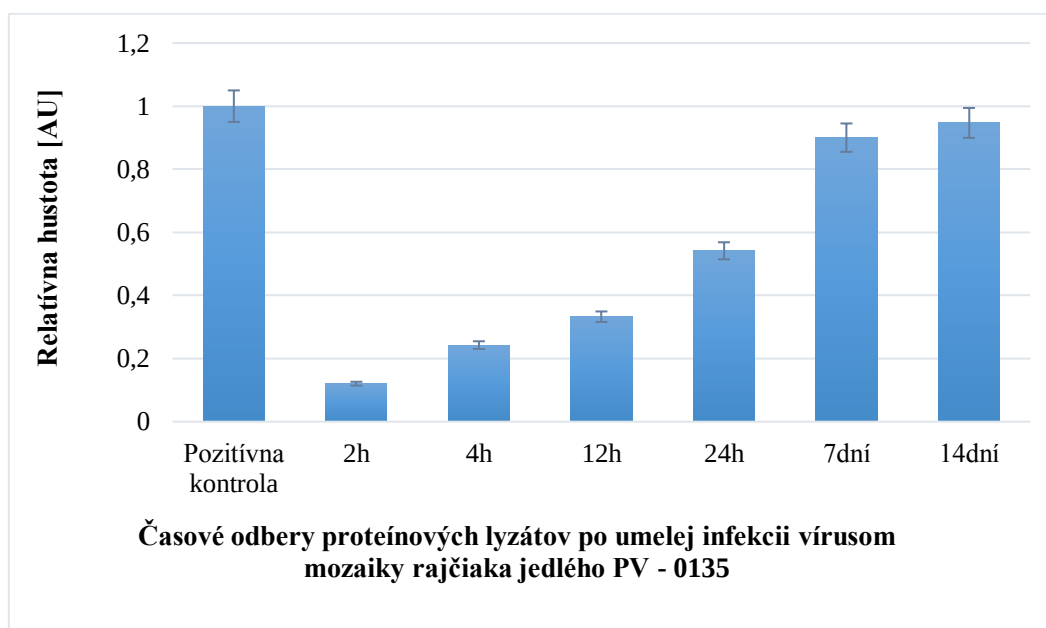
V ďalšom experimente zameranom na detekciu CP ToMV prostredníctvom analýzy Western blot sa autori López - Gresa a kol. (2012), snažia poukázať na akumuláciu CP ToMV v rôznych časových bodoch po inokulácii ToMV (1-5 dní, 7, 9, 11 13 a 16 dní). Predpokladajú, že práve detekciou vírusu v rôznych časových intervaloch umelej infekcie spolu s analýzou 32 metabolitov (vrátane organických kyselín, cukrov, fenypropanoidov, flavonoidov) NMR spektroskopiou

v kombinácii s multivariačnou analýzou údajov, môžu odhaliť úlohu obranných metabolitov zapojených počas infekcie. Súčasťou experimentu bolo aj štúdium metabolického stavu rajčiakov jedlých (*Solanum lycopersicum* cv. Rutgers), ktoré poskytovalo príslušne údaje pre metabolické inžinierstvo v zmysle vyššej odolnosti rajčiakov voči patogénom.

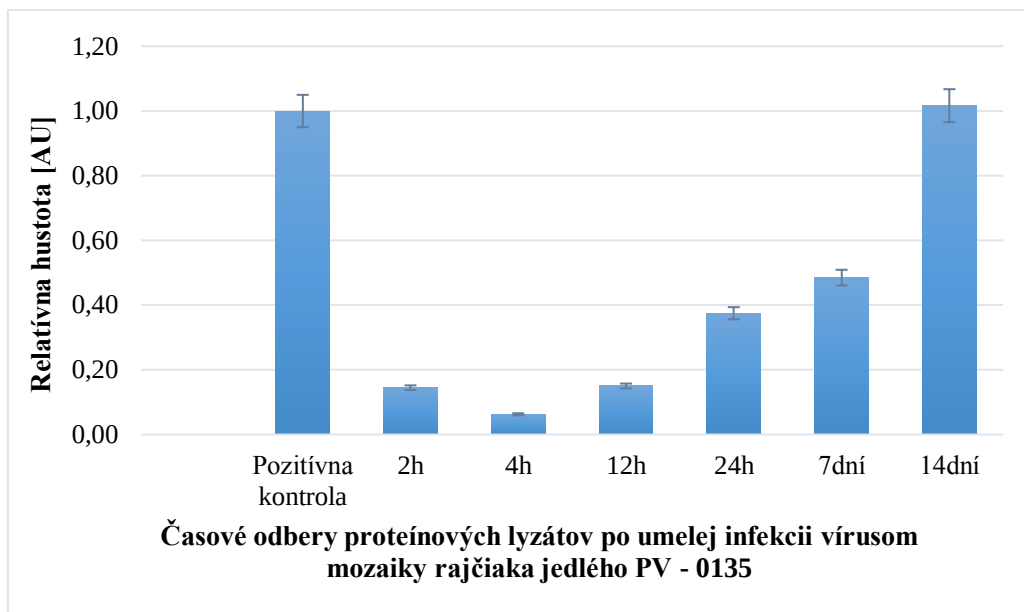
7.6 Vyhodnotenie výsledkov kvantifikácie z Western blot analýz na vybraných odrodách rajčiakov jedlých (Salus, Niki a Oskar)

Úroveň kvantifikácie výsledkov (Obrázky 22, 23 a 24) pri ktorej platí, že intenzita zdetekovaného bandu CP ToMV PV - 0135 sa zvyšuje s narastajúcou dobou umelej infekcie, bola spracovaná prostredníctvom voľne dostupného programu Image Studio Lite. Vygenerované výsledky v podobe relatívnych hustôt, vztiahnutých na rôzne časové intervaly odberov po umelej infekcii sú zobrazené na obrázkoch 25, 26, 27, 28, 29 a 30. Hodnoty relatívnych hustôt boli vztiahnuté na pozitívnu kontrolu, kedy sa jednalo o vírusové inokulum ToMV PV - 0135 (DSZM) zriedené pracovným roztokom, používaným pri izolácii proteínov z infikovaných odrôd rajčiaka jedlého.

Rozdelením časových intervalov umelej infekcie na tzv. rané štádium umelej infekcie (2 h, 4 h 12 h, 24 h) a neskoršie štádium umelej infekcie (7 dní, 14 dní), možno pozorovať výrazne rozdiely nárastu hodnôt relatívnej hustoty. Z celkového hľadiska sme porovnaním výsledkov na obrázkoch 25, 26, 27, 28, 29 a 30 bez ohľadu na koncentráciu (c_1 a c_2) odrôd rajčiaka jedlého potvrdili predpoklad, pri ktorom platí, že s narastajúcou dobou umelej infekcie sa zvyšuje aj akumulácia ToMV PV - 0135, čo podmieňuje intenzitu daného bandu, ktorú sme merali.

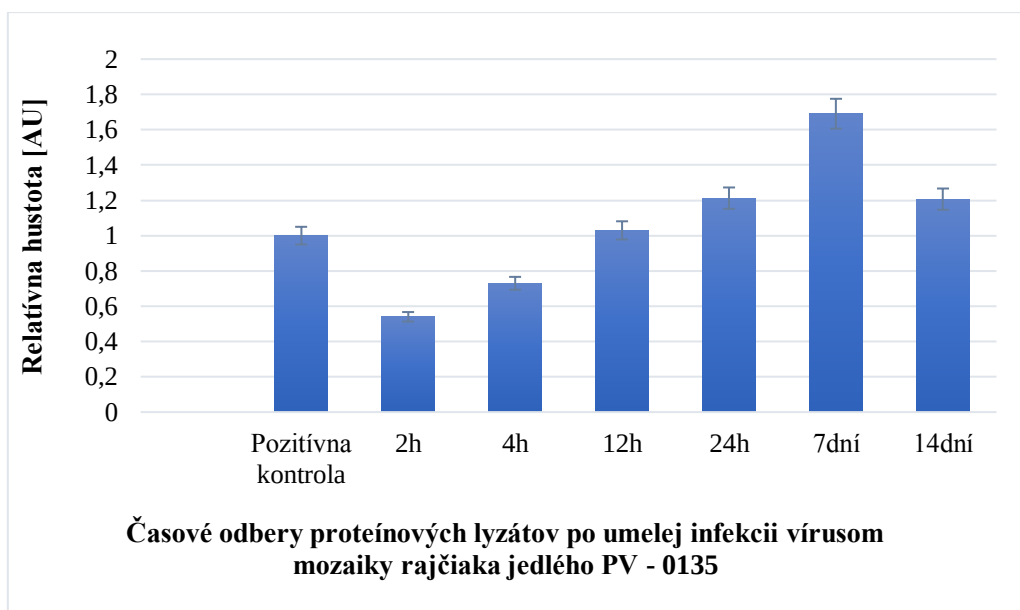


Obrázok 25: Grafické vyhodnotenie kvantifikácie analýzy Western blot pre kríčkovú odrodu rajčiaka jedlého (6 - Salus) s koncentráciou c_1 .



Obrázok 26: Grafické vyhodnotenie kvantifikácie analýzy Western blot pre kríčkovú odrodu rajčiaka jedlého (6 - Salus) s koncentráciou c_2 .

Hodnoty relatívnych hustôt reprezentujúce odrodu Salus, s ohľadom na koncentráciu c_1 a c_2 predstavujú najoptimálnejšie výsledky kvantifikácie vztiahnutej na vyššie uvedený predpoklad. Zo stĺpcových grafov (Obrázok 25 a 26) vyjadrujúcich vypočítané hodnoty relatívnych hustôt je viditeľný výrazný rozdiel medzi akumuláciou ToMV PV - 0135 v rannom štádiu a neskoršom štádiu. Rozdielnosť medzi výsledkami vychádzajúcimi z jednej odrody mohli byť spôsobené nejednotnou uniformnosťou semien, nakoľko boli z každej odrody rajčiaka jedlého vysadené 2 klíčence. Bezprostredný vplyv na výsledky kvantifikácie mala aj samotná koncentrácia vírusového inokula. Ďalej to boli faktory ako výber listu na odrode, kde došlo k mechanickému porušeniu s následnou umelou vírusovou infekciou a množstvo použitého karborunda v zmysle uľahčenia penetrácie ToMV PV - 0135 do vnútorných pletív rajčiaka jedlého.



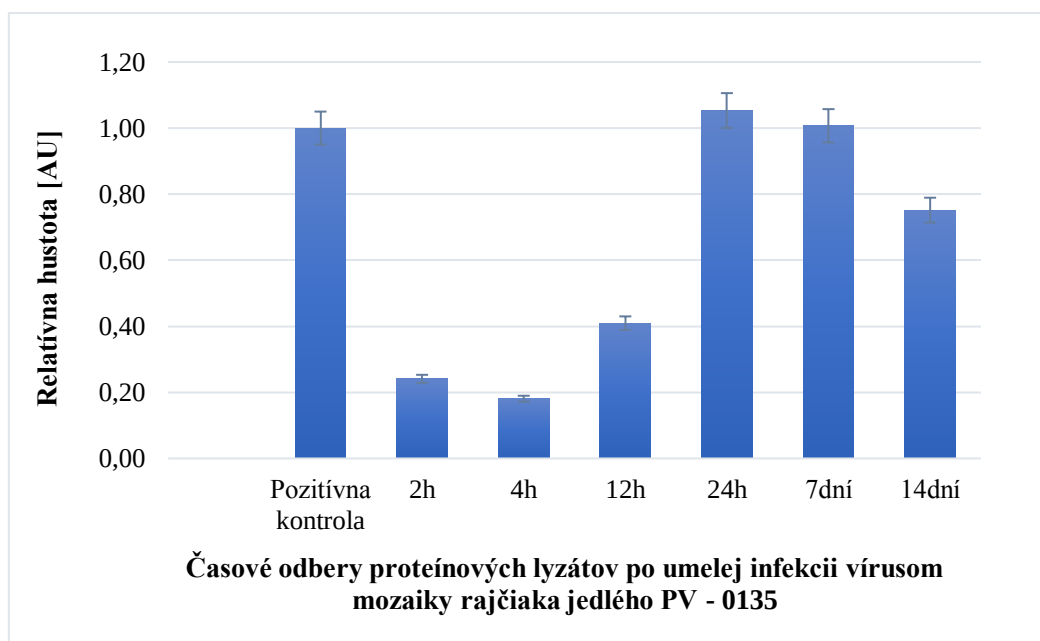
Obrázok 27: Grafické vyhodnotenie kvantifikácie analýzy Western blot pre kolíkovú odrodu rajčiaka jedlého (7 - Niki) s koncentráciou c_1 .

Trend narastania hodnôt relatívnych hustôt je pre každú odrodu rajčiaka jedlého charakteristický. Príčinou rozdielného kolísania hodnôt, hlavne v časových odberoch zodpovedajúcich 7 a 14 dňom umelej infekcie, boli rozdielne genotypy rajčiaka jedlého (Salus - kríčkový; Niki - kolíkový; Oskar - deklarovaná odolnosť voči ToMV) (Obrázok 27, 29 a 30). Ďalšími ovplyvňujúcimi faktormi mohli byť samotné gény rezistencie ako aj spôsob obrany, t.j. systémová a hypersenzitívna.

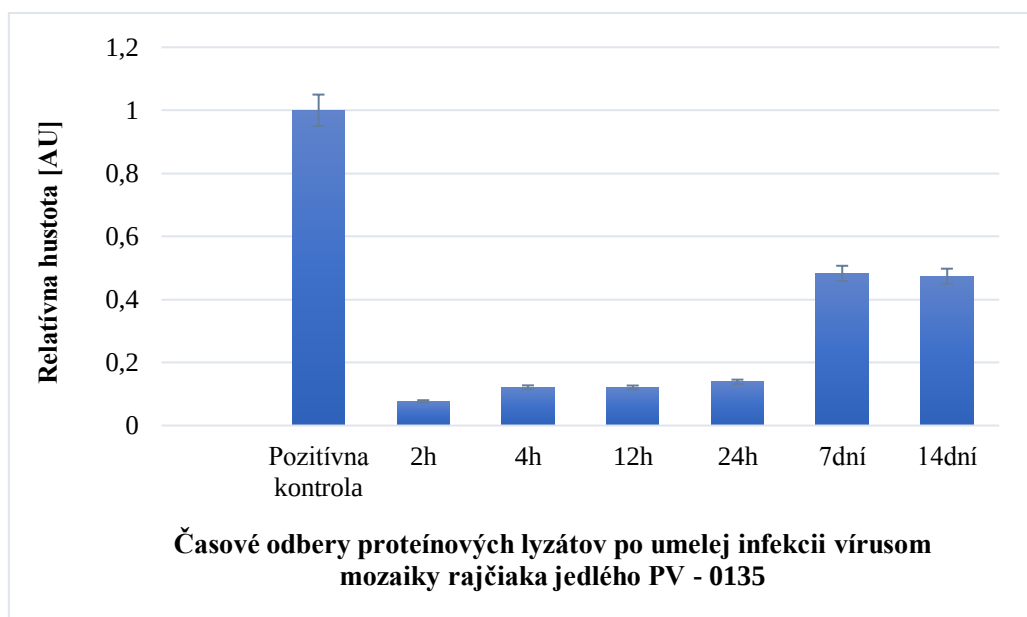
Hypersenzitívna odpoveď predstavuje komplexnú, obrannú odpoveď, ktorá je analogická s vrodenným imunitným systémom vykytujúcim sa u zvierat. Princípom hypersenzitívnej reakcie je programovaná bunková smrť (apoptóza) v miestach infekcie, s účelom zamedzenia rozširovania sa fytopatogénu. Mechanizmus obrany spočíva v detekcii patogénu prostredníctvom génov rezistencie, ktoré menia membránový potenciál a iónovú permeabilitu plazmatickej membrány (Orlandi a kol., 1992). Výsledkom je obmedzenie patogénu na nekrotické lézie, ktoré vznikli odumretím buniek (apoptózou) (Ođjakova a Hadjiivanova, 2001).

Prítomnosť hypersenzitívnej odpovede, ako reakcie na akumuláciu CP ToMV PV - 0135 predpokladáme aj pri odrodách Niki a Oskar. Nakoľko hodnoty relatívnych hustôt pri 14 dňoch (Obrázok 27), 7 a 14 dňoch (Obrázok 28), 14 dňoch (Obrázok 29) a 14 dňoch (Obrázok 30) klesajú, je pravdepodobné, že rastlinné bunky odrôd spustili mechanizmus apoptózy, s čím súvisí samotné zamedzenie rozširovania sa CP ToMV PV - 0135.

Apoptické prejavy bunky možno pozorovať intracelulárne a to prostredníctvom morfológických a biochemických znakov. V našom prípade, takýto druh analýzy opisujúci priebeh apoptózy na rastlinných bunkách odrôd rajčiaka jedlého pozorovaný nebol. Na druhej strane, fenotypový prejav rajčiakov jedlých už po 7 dňoch umelej infekcie ToMV PV - 0135 jednoznačne naznačoval štádium rozsiahlej apoptózy prechádzajúcej do štádia nekrózy. Takýto proces popisujúci priebeh bunkovej smrti sa súhrne označuje ako tzv. „aponekróza“ (Formigli a kol., 2000).

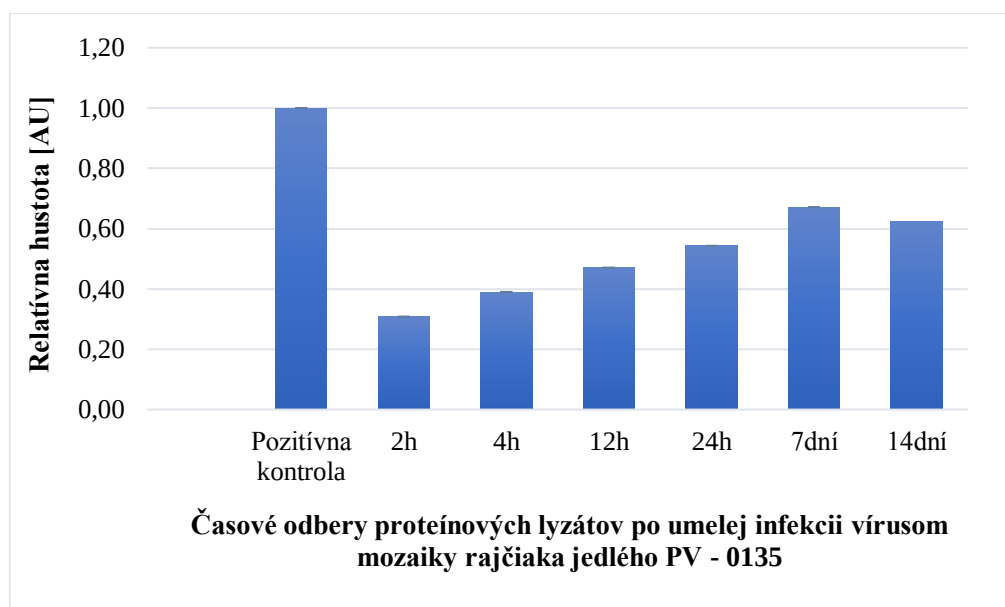


Obrázok 28: Grafické vyhodnotenie kvantifikácie analýzy Western blot pre kolíkovú odrodu rajčiaka jedlého (7 - Niki) s koncentráciou c_2 .



Obrázok 29: Grafické vyhodnotenie kvantifikácie analýzy Western blot pre odrodu, ktorá je charakteristická zvýšenou odolnosťou voči ToMV rajčiaka jedlého (20 - Oskar) s koncentráciou c_1 .

Najväčšie rozdiely medzi hodnotami relatívnych hustôt zodpovedajúcim koncentrácii c_1 a c_2 boli zaznamenané pri odrode Oskar, ktorá je deklarovaná zvýšenou odolnosťou voči ToMV (Obrázok 29 a 30). Faktory vplývajúce na akumuláciu ToMV PV - 0135, čo má za následok odlišné hodnoty relatívnych hustôt medzi koncentráciami jednej odrody, sú popísané vyššie. Z pohľadu celkovej úrovne kvantifikácie možno súhrne vyjadriť, že odroda Oskar prezentovala najnižšie hodnoty relatívnych hustôt, bez ohľadu na ich začlenenie do ranného a neskoršieho štádia umelej infekcie. Celkový výsledok kvantifikácie možno stiahnuť na vlastnosť samotnej odrody, pre ktorú je charakteristická zvýšená odolnosť voči ToMV. Hoci nevieme voči akému konkrétnemu patotypu ToMV mala odroda Oskar zvýšenú odolnosť, sa jej účinok na prítomnosť ToMV PV - 0135 do istej miery prejavil.



Obrázok 30: Grafické vyhodnotenie kvantifikácie analýzy Western blot pre odrodu, ktorá je charakteristická zvýšenou odolnosťou voči ToMV rajčiaka jedlého (20 - Oskar) s koncentráciou c_2 .

8. Záver

V experimentálnej časti práce bola v prvej fáze meraní realizovaná optimalizácia riedenia polyklonálnej protilátky založená na detekcii zmesi synteticky pripravených epitopov (Epi 1 a Epi 2). Návrh špecifických epitopov na rozpoznanie CP ToMV PV - 0135 vychádzal z počítačovo molekulárno - biologickej analýzy. Z výsledkov meraní (Tabuľka 6) zaznamenaných ELISA readerom možno potvrdiť efektívnosť vyprodukovanej protilátky (po imunizácii pokusných králikov 1, 2) rozpoznávajúcej epitopy CP ToMV PV - 0135. Po absolvovaní prvej analýzy DAS - ELISA testu, ktorý bol zameraný na výber vhodného riedenia polyklonálnej protilátky v intervale od 1:100 až 1:25 000 sa ako najvhodnejšie riedenie preukázalo riedenie 1:1000 (Obrázok 20). Výber riedenia sa vzťahoval aj na množstvo protilátky, ktoré sme mali k dispozícii. V druhej sérii DAS - ELISA testu sme overovali správnosť „nami“ navrhutej protilátky. Analýza bola realizovaná v prítomnosti celkových rastlinných proteínových lyzátov, kde pravdepodobne dochádzalo k vzniku špecifických väzieb s „našou“ protilátkou (Ab_1 a Ab_2), čo sa pri riedení 1:1000 prejavilo nemerateľnými hodnotami. Príčinou je zrejme kinetika reakcie, lebo vysoká špecifita tvorby imunokomplexov „našou“ protilátkou bola overená Western blotting analýzou. Po zmene riedenia na 1:100 boli hodnoty absorbancií počas testu DAS - ELISA merateľné a zaznamenané do tabuľky 7. V tretej sérii DAS - ELISA testu sme porovnávali „nami navrhnutú protilátku s dvoma komerčne zakúpenými protilátkami (Bioreba, DSMZ). Z tabuľky 8 je zrejmé, že prvý merateľný signál bol zaznamenaný „našou“ protilátkou a to konkrétne pri vzorke 6 c_1 (izolovaná 24 hodín po umelej infekcii) s hodnotami 0,2 ng/ μ l (Ab_1) a 0,21 ng/ μ l (Ab_2). Prvý merateľný signál zaznamenaný komerčnými protilátkami, bol zachytený až po 7 dňoch umelej infekcie pre vzorku 6 c_1 s hodnotami 0,2 ng/ μ l (Bioreba) a 0,59 ng/ μ l (DSMZ). Súhrne možno vyjadriť, že porovnaním výsledkov z Tabuľky 8 je „naša“ protilátka špecifickejšia, nakoľko vykazovala vyššiu mieru detekcie oproti protilátkam komerčným (Bioreba, DSMZ).

V ďalšej časti práce bola realizovaná analýza Western blot, čím sa ukončila proteomická úroveň stanovenia ToMV PV - 0135. Na analýzu boli použité proteínové lyzáty rajčiakov jedlých (Salus, Niki, Oskar), s koncentráciou vírusového inokula c_1 a c_2 a rôznymi časovými intervalmi (2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 7 dní, 14 dní) po umelej infekcii ToMV PV - 0135. Z výsledkov analýz uskutočnených na vybraných odrodách rajčiaka jedlého bolo možné určiť kvalitatívnu a kvantitatívnu úroveň CP ToMV PV - 0135. Kvalitatívna úroveň zodpovedala molekulovej hmotnosti CP ToMV PV - 0135, ktorá je v databáze UniProt uvádzaná ako 17,8 kDa. Uskutočnením analýz Western blot prostredníctvom „našej“ protilátky (Ab_1), sme s príslušným štandardom veľkosti molekulovej hmotnosti dokázali identickosť molekulovej hmotnosti CP ToMV PV - 0135 s hmotnosťou uvádzanou v databáze UniProt. Z obrázkov 22, 23 a 24 je zrejmé, že navrhnutá protilátka detekovala prítomnosť CP ToMV PV - 0135 nielen v neskorších fázach umelej infekcie (7 a 14 dní), ale aj v počiatočných štádiách infekcie (2 h, 4 h) vírusom mozaiky rajčiaka. Z experimentálneho hľadiska vychádzajúceho z odborných článkov je detekcia ToMV prostredníctvom Western blotu v ranných štádiách nezvyčajná. Ovplyvňujúcimi faktormi detekcie sú hlavne špecificky navrhnutá protilátka, samotný typ vírusu, jeho štádium latencie a forma akumulácie v hostiteľskom organizme. Pre zabezpečenie špecifickosti pri návrhu protilátky sme vychádzali z predpokladu, že prienikom vlastností (špecifické zloženie aminokyselín a hľadisko hydrofobicity a hydrofilicity) získame najvhodnejšie epitopy pre tvorbu imunokomplexu. Proteomickou úrovňou (DAS - ELISA, Western blotting) sme potvrdili prítomnosť ToMV PV - 0135 vo vybraných odrodách rajčiaka jedlého a navyše dokázali vysokú špecifitu „našej“ protilátky, ktorú sme predpokladali už pri jej návrhu.

Kvantitatívnu úroveň prítomnosti CP ToMV - 0135 na nitrocelulózeovej membráne sme vyhodnocovali prostredníctvom programu Image Studio Lite. Výstupné údaje, t.j. signály zodpovedajúce intenzitám daných bandov, boli prepočítané na hodnoty relatívnych hustôt. Pre lepšie porovnanie hodnôt medzi vybranými odrodami rajčiaka jedlého, boli údaje spracované do podoby stĺpcových grafov (Obrázok 25 - 30). Pri vyhodnocovaní intenzity jednotlivých bandov, ktoré boli na nitrocelulózeovej membráne umiestnené v závislosti od časového odberu po umelej infekcii (2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 7 dní, 14 dní) sme predpokladali, že s narastajúcou dobou umelej infekcie bude stúpať aj množstvo zdetekovaného CP ToMV - 0135. Porovnaním výsledkov a ich rozdelením do dvoch štádií

umelej infekcie, t.j. ranné a neskoršie sme usúdili, že hodnoty relatívnych hustôt majú tendenciu vzostupného rastu, čím sme potvrdili aj vyššie uvedený predpoklad. Navyše u niektorých odrôd rajčiaka jedlého (Niki a Oskar), bol pozorovaný klesajúci trend relatívnych hustôt v neskoších štádiách (7 dní, 14 dní), čo mohlo byť s najvyššou pravdepodobnosťou spôsobené tzv. aponekrózou.

9. Zoznam použitej literatúry

- ADKINS, S. a kol. 2003. Biological and molecular characterization of a novel tobamovirus with a unique host range. In *Plant Disease*. ISSN 0191-2917, 2003, roč. 87, č. 10, s. 1190- 1196.
- ARYA, M. a kol. 2005. Basic principles of real - time quantitative PCR. In *Expert Review of Molecular Diagnosis*. ISSN 1473-7159, 2005, roč. 5, č. 2, s. 1-11.
- ASURMENDI, S. a kol. 2004. Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*. ISSN 1091-6490, roč. 101, č. 5, s. 1415-1420.
- AYDIN, S. 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. In *Peptides*. ISSN 0196-9781, 2015, roč. 72, s. 4-15.
- BAJET, N. B. - KUROWSKI, - CH. - HIMMEL, P. 2016. Guidelines for identification of Tomato mosaic virus strains using differential hosts. [online]. 2016. [cit. 2017-10-10]. Dostupné na internete: <cppsi.ucanr.edu/files/225901.pdf>.
- BARBU, V. 2007. Molecular hybridization techniques of nucleic acids. In *Innovative Romanian Food Biotechnology*. ISSN 1843-6099, 2007, roč. 1, s. 1-12.
- BEIJERINCK, M. W. 1898. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. In *Phytopathological Classics*. 1898, č. 7, s. 31-52.
- BOL, J. F. 2008. Role of capsid proteins. In *Plant Virology Protocols*. ISSN 1064-3745, 2008, roč. 451, s. 21-31.
- BOONHAM, N. a kol. 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. In *Virus Research*. ISSN 0168-1702, 2014, roč. 186, s. 20-31.
- BOYKO, V. a kol. 2000. Cellular targets of functional and dysfunctional mutants of Tobacco mosaic virus movement protein fused to green fluorescent protein. In *Journal of Virology*. ISSN 0022-538X, 2000, roč. 74, č. 23, s. 11339-11346.
- BOYKO, V. a kol. 2007. Validation of microtubule - associated tobacco mosaic virus RNA movement and involvement of microtubule-aligned particle trafficking. In *The Plant Journal*. ISSN 1365-313X, 2007, roč. 51, č. 4, s. 589-603.
- BRANDNER, K. a kol. 2008. Tobacco mosaic virus movement protein interacts with green fluorescent protein - tagged microtubule end - binding protein 1. In *Journal of Plant Physiology*. ISSN 0176-1617, 2008, roč. 147, č. 2, s. 611-623.
- CARRINGTON, J. - C. a kol. 1996. Cell - to - cell and long - distance transport of viruses in plants. In *Plant Cell*. ISSN 1531-298X, 1996, roč. 8, č. 10, s. 1669-1681.
- CERKAUSKAS, R. 2005. Tomato diseases: tomato mosaic virus (ToMV). In *Asian Vegetable Research and Development Center*. [online]. 2015. [cit. 2017-1-10]. Dostupné na internete: < http://203.64.245.61/web_crops/tomato/ToMV.pdf >.
- CSORBA, T. a kol. 2007. The p122 subunit of tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA - and microRNA - mediated pathways. In *Journal of Virology*. ISSN 1098-5514, 2007, roč. 81, č. 21, s. 11768-11780.
- CULVER, J. N. - PADMANABHAN, M. S. 2007. Virus - induced disease: Altering host physiology one interaction at a time. In *Annual Review of Phytopathology*. ISSN 1545-2107, 2007, č. 45, s. 221-243.
- DING, B. a kol. 1992. Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. In *The Plant Cell*. ISSN 1531-98X, 1992, roč. 4, č. 8, s. 915-928.
- DOROKHOV, Y. L. a kol. 1994. Complete nucleotide sequence and genome organization of a tobamovirus infecting cruciferae plants. In *FEBS Letters*. ISSN 1873-3468, 1994, roč. 350, č. 1, s. 5-8.
- EL - ARABA, W. S. a kol. 2009. Biological, serological and molecular diagnosis of three major potato viruses in Egypt. In *International Journal of Virology*. ISSN 1816-4900, 2009, roč. 5, č. 2, s. 77-88.
- FANG, Y. - RAMASAMY, R. P. 2015. Current and prospective methods for plant disease detection. In *Biosensors (Basel)*. ISSN 2079-6374, 2015, roč. 5, č. 3, s. 537-561.

- FORMIGLI, L. a kol. 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. In *Journal of cellular physiology*. ISSN 0095-9898, 2000, roč. 182, č. 1, s. 41-49.
- GARCÍA, J. A. - PALLÁS, V. 2015. Viral factors involved in plant pathogenesis. In *Current Opinion in Virology*. ISSN 0168-1702, 2015, roč. 11 s. 21-30.
- GARIBYAN, L. - AVASHIA, N. 2013. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). In *Journal of Investigative Dermatology*. ISSN 0022-202X, 2013, roč. 133, č. 3, s. 2-8.
- GERGERICH, R. C. - DOLJA, V. V. 2006. Introduction to plant viruses, the invisible foe. In *The Plant Health Instructor*. [online]. 2006. [cit. 2017-7-05]. Dostupné na internete: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/plantviruses.aspx>>. ISSN 1935-9411.
- GINZINGER, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. In *Experimental Hematology*. ISSN 0301-472X, 2002, roč. 30, č. 6, s. 503-512.
- GOULTER, K. - RANGLES, J. 1997. Serological and Molecular techniques to detect and identify plant pathogens. In BROWN, J. F. - OGLE, H. J. (Eds.). *Plant Pathogens and Plant Diseases*. Australia: Rockvale Publications, 1997. ISBN 1 86389 439 X.
- HAGIWARA, Y. a kol. 2003. Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. In *The EMBO Journal*. ISSN 1460-2075, 2003, roč. 22, s. 344-353.
- HARRISON, B. D. - WILSON, T. M. 1999. Milestones in the research on tobacco mosaic virus. In *Philosophical transactions of the Royal Society B*. ISSN 0962-8436, 1996, roč. 354, č. 1383, s. 521-529.
- HEID, C. A. a kol. 1996. Real time quantitative PCR. In *Genome Research*. ISSN 1549-5469, 1996, roč. 6, č. 10, s. 986-994.
- HEINLEIN, M. a kol. 1995. Interaction of tobamovirus movement protein with the plant cytoskeleton. In *Science*. ISSN 1095-9203, 1995, roč. 270, č. 5244, s. 1983-1985.
- HEINLEIN, M. a kol. 1998. Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. In *The Plant Cell*. ISSN 1531-298X, 1998, roč. 10, č. 7, s. 1107-1120.
- HIRASHIMA, K. - WATANABE, Y. 2003. RNA helicase domain of tobamovirus replicase executes cell-to-cell movement possibly through collaboration with its nonconserved region. In *Journal of Virology*. ISSN 0022-538X, 2003, roč. 77, č. 22, s. 1235-2362.
- HSU, H. T. - LAWSON, R. H. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. In *Plant Disease*. ISSN 0191-2917, 1991, roč. 75, č. 3, s. 292-295.
- CHITRA, T. R. a kol. 1999. Infection of tomato and bell pepper by ToMV and TMV at different growth stages and establishment of virus in seeds. In *Journal of Plant Pathology*. ISSN 1125-4653, 1999, roč. 81, č. 2, s. 123-126.
- ISHIBASHI, K. - ISHIKAWA, M. 2016. Replication of Tobamovirus RNA. In *Annual Review of Phytopathology*. ISSN 0066-4286, 2016, roč. 54, s. 55-78.
- ISHIBASHI, K. a kol. 2012. Host membrane proteins involved in the replication of tobamovirus RNA. In *Current Opinion in Virology*. ISSN 1879-6257, 2012, roč. 2, č. 6, s. 663-668.
- ISHIKAWA, M. a kol. 1986. *In vitro* mutagenesis of the putative replicase genes of tobacco mosaic virus. In *Nucleic Acids Research*. ISSN 1362-4962, 1986, roč. 14, č. 21, s. 8291-8305.
- IZZO, V. a kol. 2006. Electrophoresis of proteins and DNA on horizontal sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. In *Immunity and Ageing*. ISSN 1742-4933, 2006, roč. 3, č. 7, s. 1-5.
- JENSEN, E. 2014. Technical review: *in situ* hybridization. In *The Anatomical Record*. ISSN 1932-8494, 2014, roč. 297, č. 8, s. 1349-1353.
- JOHNSON, A. - GRABOWSKI, M. - ORSHINSKY, A. 2015. Tomato mosaic virus and tobacco mosaic virus. [online]. 2015. [cit. 2017-2-06]. Dostupné na internete: <<https://www.extension.umn.edu/garden/fruit-vegetable/plant-diseases/tomato-mosaic-virus-tobacco-mosaic-virus/index.html>>.

- KLIOT, A. a kol. 2014. Fluorescence *in situ* hybridizations (FISH) for the localization of viruses and endosymbiotic bacteria in plant and insect tissues. In *Journal of Visualized Experiments*. ISSN 1940-087X, 2014, roč. 84, s. 1-8.
- KNAPP, E. - DAWSON, W. O. - LEWANDOWSKI, D. J. 2001. Conundrum of the lack of defective RNAs (dRNAs) associated with tobamovirus infections: dRNAs that can move are not replicated by the wild-type virus; dRNAs that are replicated by the wild-Type virus do not move. In *Journal of Virology*. ISSN 0022-538X, 2001, roč. 75, č. 12, s. 5518-5525.
- KNAPP, E. a kol. 2005. A bipartite tobacco mosaic virus-defective RNA (dRNA) system to study the role of the N-terminal methyl transferase domain in cell-to-cell movement of dRNAs. In *Journal of Virology*. ISSN 0022-538X, 2005, roč. 341, č. 1, s. 47-58.
- KOLASKAR, A. S. - TONGAONKAR, P. - C. 1990. A semi - empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. In *Febs Letters*. ISSN 0014-5793, 1990, roč. 276, č. 1-2, s. 172-174.
- KRYPUIY, M. a kol. 2006. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. In *BMC Cancer*. ISSN 1471-2407, 2006, roč. 6, č. 295, s. 1-12.
- KUBOTA, K. a kol. 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus - targeted posttranscriptional gene silencing. In *Journal of Virology*. ISSN 1098-5514, 2003, roč. 77, č. 20, s. 11016-11026.
- KUMAR, L. 2009. Methods for the diagnosis of plant virus diseases laboratory manual. [online]. 2015. [cit. 2017-2-06]. Dostupné na internete: <<http://biblio.iita.org/documents/U09ManKumarLaboratoryNothomNodev.pdf-fbeb6a750d31604ab1e6f09e3856f081.pdf>>.
- KURIHARA, Y. a kol. 2007. Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. In *The Journal of General Virology*. ISSN 0022-1317, 2007, roč. 88, č. 8, s. 2347-52.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In *Nature*. ISSN 1476-4687, 1970, roč. 227, s. 680-685.
- LI, Y. a kol. 2005. Identification of tobacco protein interacting with tomato mosaic virus coat protein and facilitating long - distance movement of virus. In *Archives of Virology*. ISSN 1432-8798, 2005, roč. 150, č. 10, s. 1993-2008.
- LIMA, J. A. A. a kol. 2012. Serology applied to plant virology. In AL - MOSLIH, M. (Eds.) Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases. InTech Europe (Croatia) : University Campus STeP Ri, 2012. ISBN 978-953-51-0370-7, s. 72-94.
- LIN, N. S. - HSU, H. Y. - HSU, H. T. 1990. Immunological detection of plan viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. In *Phytopathology*. ISSN 0031-949X, 1990, s. 824-828.
- LITTLE, M. a kol. 2000. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. In *Immunology Today*. ISSN 0167-5699, 2000, roč. 21, č. 8, s. 367-370.
- LÓPEZ - GRESA, M. P. a kol. 2012. Metabolic fingerprinting of Tomato mosaic virus infected *Solanum lycopersicum*. In *Journal of Plant Physiology*. ISSN 0176-1617, 2012, roč. 169, č. 16, s. 1586-1596.
- LOPEZ, M. M. a kol. 2008. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? In *Current Issues in Molecular Biology*. ISSN 1467-3037, 2009, roč. 11, č. 1, s. 13-46.
- LORENZ, T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. In *Journal of Visualized Experiments*. ISSN 1940-087X, 2012, roč. 63, č. 3998, s. 1-15.
- LUCAS, W. J. - DING, B. - SCHOOT, CH. 1993. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. In *New Phytologist*. ISSN 1469-8137, 1993, roč. 125, č. 3, s. 435 -476.
- LUCAS, W. J. 2006. Plant viral movement proteins: Agents for cell - to - cell trafficking of viral genomes. In *Virology*. ISSN 0042-6822, 2006, roč. 344, č. 1, s. 169-184.
- LUI, J. K. H. 2014. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. In *Annals of Medicine Surgery*. ISSN 2049-0801, 2014, roč. 3, č. 4, s. 113-116.

- MAHMOOD, T. - YANG, P. CH. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. In *North American Journal of Medical Sciences*. ISSN 1947-2714, 2012, roč. 4, č. 9, s. 429-434.
- MAKKOUK, - K. M. - HSU, - H. T. - KUMARI, - S. G. 1993. Detection of three plant viruses by dot-blot and tissue-blot immunoassays using chemiluminescent and chromogenic substrates. In *Journal of Phytopathology*. ISSN 1439-0434, 1993, roč. 139, č. 2, s. 97-102.
- MAKKOUK, K. - KUMARI, S. 2006. Molecular diagnosis of plant viruses. In *Arab Journal of Plant Protection*. ISSN 2412-5407, 2006, roč. 24, č. 2, s. 135-138.
- MÁS, P. - BEACHY, R. - N. 1999. Replication of Tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. In *The Journal of Cell Biology*. ISSN 1540-8140, roč. 147, č. 5, s. 945-958.
- McCARTNEY, H. A. a kol. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. In *Pest Management Science*. ISSN 1526-4998, 2003, roč. 59, č. 2, s. 129-142.
- McLEAN, B. G. - ZUPAN, J. - ZAMBRYSKI, P. C. 1995. Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. In *The Plant Cell*. ISSN 1531-298X, 1995, roč. 7, s. 2101-2114.
- MÉRAI, Z. a kol. 2006. Double - stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. In *Journal of Virology*. ISSN 1098-5514, 2006, roč. 80, č. 12, s. 5747-5756.
- MOYA, A. - HOLMES, E. C. - GONZÁLEZ - CANDELAS, F. 2004. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. In *Nature Reviews Microbiology*. ISSN 1740-1534, 2004, roč. 2, č. 4, s. 279-88.
- NAIDU, R. A. - HUGHES, J. A. 2001. Methods for detection of plant viruses diseases. In HUGHES, J. A. - ODU, B. O. (Eds.). *Plant Virology in Sub - Saharan Africa. Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture*, 2001, ISBN 978-131-214-9, s. 233 - 260.
- NDUNGURU, J. a kol. 2005. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. In *Virology Journal*. ISSN 1743-422X, 2005, roč. 2, č. 45, s. 1-12.
- NICAISE, V. 2014. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. In *Frontiers in Plant Science*. ISSN 1664-462X, 2014, roč. 5, č. 660, s. 1-18.
- NIKIFOROVA, M. N. - NIKIFOROV, Y. E. 2011. Chapter 2 - Molecular anatomic pathology: principles, techniques, and application to immunohistologic diagnosis. In DABBS, D. J. (Eds). *Diagnostic immunohistochemistry (Third Edition)*. Philadelphia: Elsevier/ Saunders, 2011. ISBN: 978-1-4160-5766-6, s. 42-57.
- NOUEIRY, A. O. - AHLQUIST, P. 2003. Brome mosaic virus RNA replication : revealing the role of the host in RNA virus replication. In *Annual Review of Phytopathology*. ISSN 0066-4286, 2003, roč. 41, s. 77-98.
- NOZHAT, Z. - HEDAYATI, M. 2015. *In situ* hybridization principles and applications: review article. In *Tehran University Medical Journal*. ISSN 1683-1764, 2015, roč. 73, č. 3, s. 143-157.
- ODJAKOVA, M. - HADJIIVANOVA, CH. 2001. The Complexity of Pathogen Defense in Plants. In *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. ISSN 1312-8213, 2001, roč. 27, č. 1-2, s. 101-109.
- ORLANDI, E. W. - HUTCHESON, S. W. - BAKER, C. J. 1992. Early physiological responses associated with race – specific recognition in soybean leaf tissue and cell suspensions treated with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. In *Physiological and Molecular Plant Pathology*. ISSN 0885-5765, 1992, roč. 40, č. 3, s. 173-180.
- OUKO, M. a kol. 2010. Tobacco mutants with reduced microtubule dynamics are less susceptible to TMV. In *The Plant Journal*. ISSN 1365-313X, 2010, roč. 62, č. 5, s. 829-839.
- PADGETT, H. S. 1996. Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell - to - cell spread of infection. In *The Plant Journal*. ISSN 1365-313X, 1996 roč. 10, č. 6, s. 1079-1088.
- PALLAS, V. - GARCÍA, J. A. 2011. How do plant viruses induce disease? Interaction and interference with host components. In *Journal of General Virology*. ISSN 0022-1317, 2011, roč. 92, s. 2691-2705.
- PARKER, J. M. R. - GUO, D. - HODGES, R. S. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface

- residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites. In *Biochemistry*. ISSN 0006-2960, 1986, roč. 25, č. 19, s. 5425-5432.
- POLSTON, J. N. a kol. 1991. Detection of plant virus coat proteins on whole leaf blots. In *Analytical Biochemistry*. ISSN 0003-2697, 1991, roč. 196, č. 2, s. 267-270.
- RAHMAN, M. T. a kol. 2013. Polymerase chain reaction (PCR): A short review. In *Applied Mathematics and Computation*. ISSN 0096-3003, 2013, roč. 4, č. 1, s. 30-36.
- RANGEL, E. A. a kol. 2011. Genetic variability and evolutionary analyses of the coat protein gene of Tomato mosaic virus. In *Virus Genes*. ISSN 1572-994X, 2011, roč. 43, č. 3, s. 435-438.
- REICHEL, CH. - BEACHY, R. N. 1998. Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*. ISSN 1091-6490, 1998, roč. 95, č. 19, s. 11169-11174.
- RUIZ-RUIZ, S. a kol. 2009. Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. In *Journal of Virological Methods*. ISSN 0166-0934, 2009, roč. 160, č. 1-2, s. 57-62.
- SAMBADE, A. a kol. 2008. Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. In *Traffic*. ISSN 1600-0854, 2008, roč. 9, č. 12, s. 2073-2088.
- SEVÍK, M. A. - TOHUMCU, E. K. 2011. The ELISA analysis results in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed health testing for Tobacco mosaic virus. In *Žemdirbystė = Agriculture*. ISSN 1392-3196, 2011, roč. 98, č. 3, s. 301-306.
- SCHOLTHOF, K. B. G. 2004. Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. In *Annual Review of Phytopathology*. ISSN 0066-4286, 2004, roč. 42, s. 13-34.
- SCHOLTHOF, K. B. G. a kol. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. In *Molecular Plant Pathology*. ISSN 1364-3703, 2011, roč. 12, č. 9, s. 938-954.
- SILVA, P. P. - FREITAS, R. A. - NASCIMENTO, W. M. 2011. Detection of Tomato mosaic virus in tomato seed and treatment by thermotherapy. In *Acta Horticulturae*. ISSN 2406-6168, 2011, s. 303-308.
- SOUIRI, A. a kol. 2014. Polyclonal and monoclonal antibody - based methods for detection of plant viruses. In *European Journal of Scientific Research*. ISSN 1450-216X, 2014, roč. 123, č. 3, s. 281-295.
- STREIT, S. a kol. 2009. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. In *Nature Protocols*. ISSN 1750-2799, 2009, roč. 4, č. 1, s. 37 - 43.
- SULIMENKO, T. - DRÁBER, P. 2004. A fast and simple dot-immunobinding assay for quantification of mouse immunoglobulins in hybridoma culture supernatants. In *Journal Immunological of Methods*. ISSN 0022-1759, 2004, roč. 289, č. 1-2, s. 89-95.
- SUN, W. a kol. 2001. Electrochemical detection for horseradish peroxidase-based enzyme immunoassay using *p*-aminophenol as substrate and its application in detection of plant virus. In *Analytica Chimica Acta*. ISSN 0003-2670, 2001, roč. 434, č. 1, s. 43-50.
- TAMAI, A. - MESHI, T. 2001. Tobamoviral movement protein transiently expressed in a single epidermal cell functions beyond multiple plasmodesmata and spreads multicellularly in an infection-coupled manner. In *Molecular Plant - Microbe Interactions Journal*. ISSN 0894-0282, 2001, roč. 14, č. 2, s. 126-134.
- THAITRONG, N. a kol. 2013. Implementation of microfluidic sandwich ELISA for superior detection of plant pathogens. In *Plos One*. ISSN 1932-6203, 2013, roč. 8, č. 12, s. 1-9.
- WAN, Y. - LIU, K. - WANG, D. - SHEWRY, P.R. 2000. High-molecular-weight glutenin subunits in the *Cylindropyrum* and *Vertebrata* section of the *Aegilops* genus and identification of subunits related to those encoded by thw Dx alleles of common wheat. In *Theoretical and Applied Genetics*. ISSN 1432-2242, 2000, roč. 101, č. 5 - 6, s. 879-884.
- WANG, Z. - YANG, B. 2010. Northern blotting and its variants for detecting expression and analyzing tissue distribution of mRNAs. In WANG, Z. - YANG, B. (Eds) *MicroRNA expression detection methods*. Berlin: Springer - Berlin Heidelberg, 2010. ISBN 978-3-642-04928-6, s. 83-100.
- WEBSTER, C. G. - WYLIE, S. J. W. - JONES, M. G. K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. In *Current Science*. ISSN 0011-3891, 2004, roč. 86, č. 12, s. 1604-1607.

- WYLIE, S. a kol. 1993. A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds [*Lupinus angustifolius*] [1993]. In *Australian Journal of Agricultural Research*. ISSN 0004-9409, 1993, roč. 44, s. 41-51.
- ZAMBRYSKI, P. 1995. Plasmodesmata: plant channels for molecules on the move. In *Science*. ISSN 1095-9203, 1995, roč. 270, č. 5244, s. 1943.

Názov: STANOVENIE TOBAMOVÍRUSOV NA PROTEOMICKEJ ÚROVNI

Autori: Mgr. Daniel Mihálik, PhD.: Žilinská univerzita v Žiline - Výskumný ústav vysokohorskej biológie, Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby
Ing. Miroslav Glasa, DrSc.: Biomedicínske centrum SAV, Virologický ústav
Mgr. Michaela Mrkvová: UCM, FPV, Katedra biotechnológií v Trnave
Ing. Jozef Gubiš, PhD.: Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby

Vydavateľ: Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby
Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany
Rok vydania: 2019
Počet strán: 54 strán
Formát: A4

Nepredajné/Určené pre vlastnú potrebu.
Rukopis neprešiel odbornou ani jazykovou úpravou.
Za odborný obsah zodpovedajú autori.

